

# „Heiße“ Schilddrüsenknoten bei Kindern: Mutationshäufigkeiten und Mutationsmuster aktivierender TSH-Rezeptor- und Gs alpha- Mutationen

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**Dr. med.**

**an der Medizinischen Fakultät**

**der**

**Universität Leipzig**

eingereicht von:	Eva Typlt
Geburtsdatum / Geburtsort:	08.03.1985 / Leipzig
angefertigt an / in:	Universität Leipzig / Universitätsklinikum Leipzig Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie
Betreuer:	Prof. Dr. med. Ralf Paschke

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 26.01.2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Bibliografische Zusammenfassung.....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>III.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>- 7 -</b>
1.1	Epidemiologie, Klinik und Diagnostik.....	- 8 -
1.1.1	Maligne Knoten.....	- 9 -
1.1.2	Benigne Knoten.....	- 9 -
1.2	Molekulare Pathogenese von Schilddrüsentumoren.....	- 10 -
1.2.1	Schilddrüsenspezifische Pathogenese.....	- 10 -
1.2.1.1	TSHR.....	- 10 -
1.2.1.2	Gsa.....	- 10 -
1.2.2	Allgemeine Tumorgenese.....	- 11 -
1.2.2.1	RAS- und BRAF- Punktmutationen.....	- 11 -
1.2.2.2	PAX8/PPAR $\gamma$ - und RET/PTC- Rearrangements.....	- 12 -
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung.....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>- 14 -</b>
3.1	Patientenkohorte.....	- 14 -
3.2	Nukleinsäure- Isolation.....	- 18 -
3.3	cDNA- Synthese.....	- 18 -
3.4	Nachweis von Rearrangements mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	- 19 -
3.5	Nachweis von Punktmutationen mittels High- Resolution- Melting (HRM).....	- 19 -
3.6	Nachweis von Punktmutationen mittels Pyrosequenzierung.....	- 22 -
3.7	Funktionelle Charakterisierung der TSHR- Mutation A538T.....	- 24 -
3.7.1	Zielgerichtete Mutation.....	- 24 -
3.7.2	Zellkultur und Expression der TSHR- Mutation.....	- 24 -
3.7.3	FACS- Analyse.....	- 24 -
3.7.4	cAMP- Akkumulationsassay.....	- 25 -
3.7.5	IP- Akkumulationsassay.....	- 25 -
3.7.6	Lineare Regressionsanalyse (LRA).....	- 25 -
3.8	Statistische Auswertung.....	- 26 -
3.9	Datenbankrecherche.....	- 26 -
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>- 27 -</b>
4.1	Mutationsanalyse.....	- 27 -
4.2	Funktionelle Charakterisierung der neu identifizierten TSHR-Mutation A538T.....	- 29 -

4.3	Vergleich mit Literaturdaten .....	- 31 -
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>- 44 -</b>
<b>IV.</b>	<b>Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....</b>	<b>- 53 -</b>
<b>V.</b>	<b>Publikation.....</b>	<b>- 54 -</b>
<b>VI.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>- 55 -</b>
<b>VII.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>- 56 -</b>
<b>VIII.</b>	<b>Erklärung über die Vorbehaltlichkeit der Verfahrenseröffnung zur Verleihung des Titels Dr. med.....</b>	<b>- 57 -</b>

# **I. Bibliografische Zusammenfassung**

Typlt, Eva

„Heiße“ Schilddrüsenknoten bei Kindern:

Mutationshäufigkeiten und Mutationsmuster aktivierender TSH-Rezeptor- und Gs alpha- Mutationen

Universität Leipzig, Dissertation

57 Seiten; 140 Literaturquellen, 2 Abbildungen, 11 Tabellen

Referat:

Szintigrafisch heiße Schilddrüsenknoten (HTNs) bei Kindern sind selten. Ihre Malignitätsrate wird als höher beschrieben im Vergleich zu der Erwachsenenpopulation. Es wurden in dieser Dissertation klinische und molekulare Daten von 33 Kindern (29 benigne und 4 maligne HTNs) untersucht.

In 17 der 29 benignen HTNs (59%) konnte eine TSHR- Mutation nachgewiesen werden. Die häufigste Mutation war die M453T (8 von 29 Proben). T632I- und D633Y- Mutationen konnten jeweils in zwei Fällen detektiert werden. Alle anderen gefundenen TSHR- Mutation wurden jeweils nur in einer Probe festgestellt, inklusive die neu aufgetretene Mutation A538T. Eine NRAS- Mutation wurde in einem HTN mit einer M453T- Mutation gemeinsam nachgewiesen. Ein PAX8/PPAR $\gamma$ - Rearrangement konnte in einem malignen Knoten (follikuläre Variante eines papillären Schilddrüsenkarzinoms; fvPTC) detektiert werden. Ebenfalls konnte in einem malignen HTN (papilläres Schilddrüsenkarzinom; PTC) eine T632I- Mutation nachgewiesen werden.

Der Prozentsatz an TSHR- mutations-positiven HTNs in Kindern und Heranwachsenden lag in dem bei Erwachsenen beschriebenen Bereich. Auffällig war die signifikante Häufung der M453T- Mutation in der Kinderpopulation. Die beschriebene erhöhte Malignitätsrate der HTNs bei Kindern scheint nicht mit RAS- , BRAF- , RET/PTC- oder PAX8/PPAR $\gamma$ - Mutationen assoziiert zu sein.

## II. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bTSH	Bovines Thyreotropin (Rinderthyreotropin)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxiribonukleinsäure)
FA	Follikuläres Adenom
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FG	Follicular goiter (adenomatöses Struma)
ft3	Frei im Blut zirkulierendes Trijodthyronin
ft4	Frei im Blut zirkulierendes Thyroxin
FTC	Follicular Thyroid Carcinoma (Follikuläres Schilddrüsenkarzinom)
Gq $\alpha$	G <sub>q</sub> -Protein alpha Untereinheit
Gs $\alpha$	G <sub>s</sub> -Protein alpha Untereinheit
HRM	High Resolution Melting (Hoch auflösendes Schmelzverfahren)
HTN	Hot Thyreoid Nodule (Heißer Schilddrüsenknoten)
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IgG	Immunglobulin Typ gamma
IP	Inositolphosphat
LRA	Lineare Regressionsanalyse
MAPK	Mitogen- Aktivierende- Protein- Kinase
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase-Kettenreaktion)
PKD	Proteinase K Digestion Buffer (PKD- Puffer)
PTC	Papillary Thyroid Carcinoma (Papilläres Schilddrüsenkarzinom)
RBC	red blood cells (rote Blutzellen, Erythrozyten)
rhTSH	Recombinant human thyrotropin (rekombinantes menschliches Thyreotropin)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SD	Schilddrüse
TG-Ak	Anti- Thyreoglobulin- Antikörper
TPO-Ak	Anti- Thyreoperoxidase- Antikörper
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon (Thyreotropin)
TSHR	Thyrotropin- releasing hormone receptor (Thyreotropinrezeptor)

### III. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	LRA- Analyse .....	- 30 -
Abbildung 2	Vergleich von Kinder- und Erwachsenenpopulation .....	- 32 -

#### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Referenzwerte der klinisch- chemischen Analyten .....	- 15 -
Tabelle 2	Patientenkohorte .....	- 16 -
Tabelle 3	Primer zum Nachweis von PAX8/PPAR $\gamma$ - und RET/PTC- Rearrangements mittels Multiplex qPCRs. ....	- 20 -
Tabelle 4	Primer zum Nachweis von BRAF- / KRAS- / NRAS- und TSHR- Mutationen mittels High Resolution Melting-qPCR .....	- 21 -
Tabelle 5	Primer zum Nachweis von TSHR- / Gs $\alpha$ - / HRAS- Punktmutationen mittels Pyrosequencing .....	- 23 -
Tabelle 6	Mutationsanalyse der benignen Knoten .....	- 28 -
Tabelle 7	Mutationsanalyse der malignen Knoten .....	- 28 -
Tabelle 8	Ergebnisse der Funktionsbestimmung der neu publizierten Mutation A538T .....	- 30 -
Tabelle 9	Fälle von heißen benignen Schilddrüsenknoten in Kindern und Heranwachsenden ( $< 25$ Jahre) mit nachgewiesener somatischer TSHR- Mutation .....	- 34 -
Tabelle 10	Fälle von heißen malignen Schilddrüsenknoten in Kindern und Heranwachsenden ( $< 25$ Jahre) mit nachgewiesener somatischer TSHR- Mutation .....	- 35 -
Tabelle 11	49 publizierte Fälle mit M453T- Mutation .....	- 37 -

# 1 Einleitung

Szintigrafisch heiße Schilddrüsenknoten (HTNs) bei Kindern sind eine selten vorkommende Erkrankung. Während der letzten 28 Jahre wurden nur 28 Fallberichte von HTNs in Kindern veröffentlicht, wobei nur in sechs Studien über mehrere Fallbeispiele zusammenfassend berichtet wurde (3, 4, 16 oder 31 Fälle (1-6)). Insgesamt wurden 84 benigne und 14 maligne HTNs bei Kindern publiziert. Ergebnisse von einer gleichzeitigen Mutationsanalyse des Thyreotropinrezeptors (TSHR) wurden in 24 benignen und 1 malignen HTN von Kindern beschrieben (Tabelle 9, Tabelle 10). Demnach gibt es keine systematische Mutationsanalyse des TSHR in großen Gruppen von Kindern, wo hingegen die Prävalenz und die Varianten von somatischen Mutationen des TSHR in HTNs von Erwachsenen umfangreich untersucht wurden.

In Erwachsenen sind HTNs mit einem geringen Malignitätsrisiko assoziiert (7). Malignitätsraten von 1 - 10% wurden in verschiedenen Studien beschrieben, jedoch wurde dabei nicht verifiziert, ob sich das Karzinom tatsächlich in dem HTN befindet. Im Gegensatz dazu konnte bei Kindern eine deutlich höhere Rate an Malignität von 9,7 bis zu 50% (Mittelwert: 26,4%; (8)) beobachtet werden. Diese Tatsache führte zu einem veränderten diagnostischen Ansatz in der Behandlung von HTNs bei Kindern (7).

Entsprechend der klinischen Erfahrung bei Erwachsenen und transgenen Mausmodellen führt eine aktivierende TSHR- Mutation üblicherweise nicht zu Malignität (9). Deshalb wurde nach zusätzlichen Mutationen, welche in papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC) oder follikulären Schilddrüsenkarzinomen (FTC) häufig auftreten, in HTNs geforscht. Diese Studien konnten jedoch nur eine zusätzliche PAX8/PPAR $\gamma$ - Mutation detektieren (10). Jedoch ist anzunehmen, dass HTNs bei Kindern aufgrund der erhöhten Malignitätsrate auch eine höhere Rate an anderen Mutationen zusätzlich zum TSHR aufweisen.

Aufgrund einer erhöhten Malignitätsrate im Vergleich zu Erwachsenen (11, 12) und einem bisher nur geringen Kenntnisstand über Mutationshäufigkeiten und -muster widmet sich diese Studie erstmals der genauen Untersuchung einer Kinderpopulation mit diesem Krankheitsbild. Möglicherweise wird damit ein erster Ansatz zur Klärung der Pathogenese dieser Erkrankung bei Kindern aufgezeigt.

Bekannte Gene, welche mit Tumorgenese, Hyperthyreose und heißen Knoten bei Erwachsenen in Zusammenhang gebracht werden konnten, dienten als Grundlage für die Probenanalyse in dieser Studie. Es wurde dafür ein Panel mit folgenden zu untersuchenden Genen zusammengestellt: Thyreotropin- Rezeptor (TSHR), stimulatorisches G- Protein  $\alpha$  Untereinheit (G $\alpha$ ), BRAF, RAS- Gene (H-, N-, KRAS) und die Rearrangements PAX8/PPAR $\gamma$ , RET/PTC1 und RET/PTC3.

## 1.1 Epidemiologie, Klinik und Diagnostik

Schilddrüsenknoten sind mit einer Prävalenz von 3-5 % in der erwachsenen Bevölkerung ein relativ häufig anzutreffendes Krankheitsbild (13-15). Mit steigendem Alter erhöht sich auch die Erkrankungs-wahrscheinlichkeit von 1% in der zweiten Lebensdekade bis zu 5% in der sechsten Lebensdekade. Frauen sind etwa viermal häufiger betroffen als Männer (16, 17). Bestimmte Risikofaktoren wie Jodmangel, Rauchen, Bestrahlung des Halses oder Kopfes sowie familiäre Prädisposition begünstigen die Entstehung von Schilddrüsenknoten ebenfalls. In den meisten Fällen sind die Knoten jedoch gutartig und asymptomatisch. Nur circa 5% der Knoten sind Karzinome (7, 18).

Bei Kindern, vor der Pubertät, liegt die Inzidenz an Schilddrüsenknoten lediglich bei maximal 1,5% (19-21). Dabei machen autonome Adenome nur 3% der Schilddrüsenerkrankungen von Kindern aus (22). Häufigstes Krankheitsbild der SD ist in dieser Population der Morbus Basedow (22, 23), dicht gefolgt von angeborenen Hyperthyreosen, bedingt durch eine immunologische Schilddrüsenerkrankung der Mutter (24). Jeder Knoten in dieser Altersgruppe sollte aufgrund des hohen Malignitätsrisikos von bis zu 50% (19-21) mit einem verschärften, eher operativen, Therapievorgehen behandelt werden. Für die Diagnostik von autonomen Schilddrüsenknoten spielt die Kontrolle von Laborparametern, wie zum Beispiel des thyroideotropen Hormons (TSH) und Calcitonins, sowie die Schilddrüsensonografie und -szintigrafie eine wichtige Rolle (7, 25-27).

Patienten mit autonomen Schilddrüsenknoten fallen laborchemisch mit der Verminderung des TSH bei möglicherweise erhöhten Schilddrüsenhormonen (freies Trijodthyronin (fT3) und freies Thyroxin (fT4)) auf. Die Abwesenheit von nachweisbaren SD-spezifischen Immunglobulinen schließt eine immunologische Ursache der Symptome aus. Meist tritt eine, zumindest sonografisch nachweisbare oder palpable Schwellung auf. Sie haben keinen Exophthalmus, weisen aber dennoch Symptome der Hyperthyreose, wie z.B. Tachykardie und Wachstumsbeschleunigung, im Kindesalter, auf. Malignitätsverdächtig wird der klinische Befund wenn der Knoten sich als fest und in der Umgebung verwachsen darstellt. Sollte er zudem noch nicht schluckverschieblich sein und ist eine Paralyse der Stimmbänder feststellbar, so liegt der Verdacht für ein Karzinom nahe.

Der Nachweis der Autonomie des verdächtigen Befundes (erhöhte Schilddrüsenhormone bzw. vermindertes TSH und/oder Knoten-Befund) erfolgt mittels Szintigrafie und wird durch die erhöhte Aufnahme von radioaktiv markiertem Iod oder radioaktiven Technetium-Isotopen (Natrium-<sup>99m</sup>Technetium-Pertechnetat; Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) erbracht. Das Signal des normalen Schilddrüsengewebes wird in autonomen Geweben durch die radioaktive Anreicherung im Tumor zum Teil derart stark überlagert, dass man im szintigrafischen Bild nur einen oder auch mehrere Herde von angereichertem Material sieht, welche man als 'heißen Knoten' bezeichnet. Von 'toxischen Knoten' spricht man, wenn eine gleichzeitige symptomatische Hyperthyreose vorliegt. Ein Knoten, welcher größer als 3cm im Durchmesser ist, ist deutlich häufiger toxisch im Vergleich zu Knoten unter 2,5cm Durchmesser (28, 29).



### **1.1.1 Maligne Knoten**

Schilddrüsen Karzinome sind die häufigsten endokrinen Tumore. Maligne, gut differenzierte Schilddrüsentumore, welche >90% der Tumore der SD repräsentieren, können in follikuläre (FTC) und papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC) unterteilt werden. Sie entstammen dem thyreozytären Follikel­epithel und haben unterschiedliche klinische Charakteristika und Prognosen.

Histologisch ist das Fehlen einer bindegewebigen Kapsel, das Einwachsen der Zellen in die Kapsel und die vaskuläre Invasion, sowie der Nachweis von Metastasen und Pleomorphismus als Malignitätskriterium von Bedeutung. PTC weisen histologisch eine papilläre Struktur mit klar ausgeprägtem fibrovaskulären Ansatz auf. Die Zellkerne sind als sogenannte Milchglaskerne ausgebildet oder deutliche Kernpolymorphismen sind sichtbar. Teilweise können auch Psammomkörper nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu weisen FTC eine follikuläre Gewebestruktur innerhalb eines trabekulären oder festen Zellverband auf. Vereinzelt können sie zumindest in Teilen bekapselt sein.

Die zwei großen Gruppen des follikulären und des papillären Karzinoms der SD repräsentieren dabei circa 80% aller Schilddrüsenkarzinome innerhalb der Erwachsenenpopulation. Bei Kindern sind maligne Schilddrüsenveränderungen sehr selten und kommen nur mit einer Inzidenz von 0,2 - 5 Fällen pro Million pro Jahr vor. Dabei sind Mädchen etwas häufiger betroffen (30). Insgesamt treten bei Kindern mehr papilläre Läsionen auf (30).

### **1.1.2 Benigne Knoten**

In der SHIP- Studie (Study of Health in Pomerania (31)) konnte eine Häufigkeit von 20,2% Schilddrüsenknoten an der Gesamtpopulation aufgezeigt werden. Adenome sind die häufigsten Schilddrüsenerkrankungen. Histologisch sind es Adenome mit einer Kapsel oder adenomatöse Knoten des Schilddrüsengewebes ohne umgebende bindegewebige Kapsel (32-34). Sie sind häufig funktionell autonome Schilddrüsenknoten, welche sich als einzelne (follikuläre Adenome (FA)) oder auch mehrere (adenomatöse Struma (AG)) szintigrafische HTNs darstellen.

Die Autonomie wird hierbei durch eine ungehemmte Produktion und Sekretion von Schilddrüsenhormonen, unabhängig von der Plasmakonzentration von Thyreotropin (TSH), hervorgerufen. Die Sekretion von TSH wird deshalb gehemmt und das verbleibende extranoduläre Schilddrüsengewebe wird nicht mehr stimuliert, wodurch es die Hormonproduktion einstellt. Die autonomen Follikelzellen können durch eine konstitutive Mutation im TSHR oder in dessen Signalkaskade betroffen sein.

## 1.2 Molekulare Pathogenese von Schilddrüsentumoren

### 1.2.1 Schilddrüsenspezifische Pathogenese

#### 1.2.1.1 TSHR

Der TSH- Rezeptor (TSHR) gehört zu der Gruppe der G- Protein- gekoppelten Rezeptoren. Er hat genau wie die anderen Rezeptoren dieser Gruppe eine Struktur aus 7 transmembranen Segmenten, 3 extra- und 3 intrazelluläre Schleifen, ein extrazelluläres Amino- Ende und ein intrazelluläres Carboxy- Ende. Im Genom befindet sich diese Information auf dem Chromosom 14 und wird in 10 Exons kodiert. Die ersten 9 Exons stellen die große extrazelluläre Domäne des Rezeptors dar und durch Exon 10 werden die transmembranen Anteile und das Carboxy- Ende repräsentiert. Der Rezeptor koppelt auf zytoplasmatischer Seite an die  $\alpha$ - Untereinheit des  $G_s$ - Proteins ( $G_{s\alpha}$ ) und vermittelt somit über die Aktivierung der Adenylatzyklase und der damit verbundenen Konzentrationssteigerung von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) seine Wirkung. Bei höheren Konzentrationen von Thyreotropin wird zusätzlich auch die  $\alpha$ - Untereinheit des  $G_q$ - Proteins ( $G_{q\alpha}$ ) am Rezeptor gebunden und aktiviert. Dabei wird Phospholipase C aktiviert, wodurch es zum Anstieg von Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) kommt, welche die Iodifizierung und die Hormonsynthese regulieren. Über cAMP selbst werden die Hormonabgabe und das Zellwachstum gesteuert (35, 36). Somit lässt sich erklären, warum bei Mutationen, die hauptsächlich eine Erhöhung des cAMP zur Folge haben und nur zum Teil auch den  $G_q$ - Weg beeinflussen, Tumore entstehen. Meist äußern sie sich als autonome Adenome, die auf eine somatische Punktmutation im TSHR zurückzuführen sind. Es sind jedoch auch familiäre und sporadische Keimbahnmutationen oder Deletionen bekannt, welche zu Hyperthyreosen aufgrund einer TSHR- Mutation führen. Durch die Mutationen kommt es zu einer Konformationsänderung, welche eine veränderte Rezeptorfunktion zur Folge hat (37). Bisher sind 95 verschiedene aktivierende Punktmutationen und 3 Deletionen (<http://www.tsh-receptor-mutation-database.org>) in hyperthyreoten Patienten identifiziert worden, wohingegen bei Kindern bisher nur 14 dieser Mutationen nachgewiesen wurden (Tabelle 9). Aufgrund von lediglich Einzelfallbeschreibungen oder nur geringer Gruppengröße ohne Populationsanalyse ist eine Angabe von Inzidenzraten hierfür nicht möglich. In der Erwachsenenpopulation werden unterschiedlich hohe Inzidenzen von TSHR- Mutationen mit 38 - 82% der autonomen Schilddrüsenknoten angegeben (5, 38-46).

#### 1.2.1.2 $G_{s\alpha}$

Als weitere Ursache für heiße Knoten wurden aktivierende Mutationen der  $\alpha$ - Untereinheit des  $G_s$ - Proteins beschrieben, welche normalerweise die intrazelluläre Übertragung des TSHR- Signals bewirken. Sie treten in Erwachsenenpopulationen bei benignen HTNs mit einer Häufigkeit von 38 - 43% der Fälle auf (5, 38, 39, 41-46). Bei Kindern konnten sie bis jetzt nur in einem Fall nachgewiesen werden (47).

### 1.2.2 Allgemeine Tumorgenese

Bei der Entstehung von malignen SD- Tumoren sind mutmaßlich ebenfalls ubiquitär im Organismus genutzte Signalwege von Bedeutung. Der mitogen- aktivierende Protein- Kinase- Weg (MAPK), mit BRAF- und den RAS- Proteinen (H-, N-, KRAS) als Komponenten einer komplexen Signalkaskade, dient dabei unter anderem der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und der Apoptose. Veränderungen in diesem Signalweg sind als Ursache von Tumoren bereits zuvor beschrieben worden. So wurden unter anderem in Kolon- Karzinomen, malignen Melanomen und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen Fälle von BRAF- Mutationen publiziert (48, 49). RAS- Veränderungen traten ebenfalls in Kolon- Karzinomen und Harnblasenkarzinomen auf (50). Häufig treten dabei somatische Punktmutationen (BRAF-, RAS- Gen) und chromosomale Umlagerungen (im Folgenden: *Rearrangements*; RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPAR $\gamma$ ) auf. Die häufigsten *Rearrangements* sind vor allem RET/PTC1, RET/PTC3 und PAX8/PPAR $\gamma$ . Während die RET/PTC- *Rearrangements* insbesondere den MAPK- Signalweg beeinflussen wirken PAX8/PPAR $\gamma$ - Veränderungen direkt auf die nukleäre Transkription. Beide fördern somit die Tumorgenese in den betroffenen Geweben (51).

#### 1.2.2.1 RAS- und BRAF- Punktmutationen

Die rat- sarcoma (RAS)- GTPasen sind Teil der MAPK- Kaskade. Die Gene kodieren für membran-assoziierte Guanosin- Nukleotid- Bindungsproteine, welche eine Rolle in der Signaltransduktion der Tyrosinkinase- und G- Protein-gekoppelten Rezeptoren spielen und die Zellproliferation und Zellapoptose beeinflussen. Somatische Punktmutationen (Häufigkeit: NRAS Codon 61 > HRAS Codon 61 > KRAS Codon 12/13) führen in den RAS- GTPasen zu erhöhter GTP- Affinität beziehungsweise zur Inhibition der autokatalytischen Funktion. Daraus resultiert eine Daueraktivität des MAPK- Signalweges mit resultierender genomischer Instabilität sowie maligner thyreozytärer Transformation (8, 52-58). Bisher wurden RAS- Mutationen sowohl in gut- (59) als auch in bösartigen Tumoren (60) beschrieben. Dabei treten sie in circa 40-53% der Fälle von FTC und in circa 0-21 % der PTC auf und werden als frühzeitiger Schritt der Tumorgenese angesehen (60) . Sie können deshalb auch in 20- 40% der follikulären Schilddrüsenadenomen nachgewiesen werden (51, 61-63). RAS- Mutationen im Kindesalter sind jedoch eher selten (64).

Das BRAF- Protein ist Teil einer Molekülgruppe, welches von RAS- Proteinen kontrolliert wird und die zelluläre Antwort auf Wachstumssignale intrazellulär vermittelt. Die *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog-B* (BRAF)- Kinase beeinflusst über den MAPK- Signalweg Zellzyklus, Zellüberleben und Zellapoptose (65, 66). 98% der BRAF- Mutationen sind dabei einer Punktmutation im Exon 15 (T1799A) des BRAF- Gens geschuldet, in Folge deren es zum Austausch eines Valin zu Glutamat auf Codon 600 kommt (BRAF<sub>V600E</sub> - im Folgenden nur noch BRAF genannt). Es resultiert eine kontinuierliche Aktivität der BRAF- Kinase (66-69). Die

BRAF- Mutationen sind wahrscheinlich initial an der Tumorentstehung beteiligt (51), fördern aber auch dessen weitere Entdifferenzierung und Progression (66). Studien berichten über einen schweren Verlauf, eine initiale Diagnose erst im späteren Krankheitsstadium und eine schlechtere Prognose. BRAF- Mutationen treten in 29 - 83% aller Fälle von PTC bei Erwachsenen (69) auf und konnten bisher als spezifischer Marker für PTC nachgewiesen werden. Auch in PTC von Kindern konnten in 63% der Fälle BRAF- Mutationen beschrieben werden (70).

#### **1.2.2.2 PAX8/PPAR $\gamma$ - und RET/PTC- Rearrangements**

Erstmals in FTC detektiert wurde das Rearrangement PAX8/PPAR $\gamma$  (71). Das Paired Box Protein 8 (PAX8) ist ein nukleärer thyreozytärer Transkriptionsfaktor, der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) ein nukleärer Hormonrezeptor und Tumorsuppressor (71-73). Es wird angenommen, dass die Varianten des PAX8/PPAR $\gamma$ - Fusionsproteins die normale Funktion von PPAR $\gamma$  beeinflussen (72). Eventuell wirkt das Fusionsprotein als dominant- negativer Inhibitor der PPAR $\gamma$ - induzierten Genaktivität.

Neuere Studien belegen diese Funktion jedoch nicht (74), so dass die genaue Funktionsweise noch zu klären ist. Unabhängig davon ist es bisher ausschließlich in follikulären Läsionen mit unterschiedlichen Inzidenzen (FTC 25-63% (60); FA 4-33%; fvPTC 37,5% (71, 75-78)) nachweisbar. Eine weitere genetische Veränderung mit resultierendem Fusionsprotein sind die Rearrangements RET/PTC1 und RET/PTC3. Hier erzeugen somatische Umlagerungen am rearranged during transfection (RET)- Gen abberante Fusionsgene, welche für eine permanent aktivierte Rezeptortyrosinkinase kodieren. Es resultiert eine Daueraktivierung der MAPK- Kaskade mit Entdifferenzierung und Tumorgenese der Schilddrüsenzellen (79, 80). Mittlerweile kennt man mehr als 15 Fusionsproteine dieser Art, jedoch sind RET/PTC1 und RET/PTC3 die am häufigsten auftretenden Mutationen (81-85). Hierbei wird RET/PTC1 überwiegend in klassischen, sklerotisierenden Varianten des PTC nachgewiesen und RET/PTC3 eher in soliden Varianten des PTC. Die Häufigkeiten der Mutationen variieren abhängig von der geografischen Herkunft, dem Alter der Patienten, der Strahlungsexposition und der Untersuchungsmethode sehr stark zwischen 3-85% in der Erwachsenenpopulation (60, 80, 86) und zwischen 3-35% bei malignen Knoten von Kindern (87). Beide Mutationen konnten jedoch mit dem Vorhandensein von Metastasen und schnellem Krankheitsfortschritt bei Kindern assoziiert werden (88). Es wurde eine Häufung von Tumoren nach Strahlenbelastung mit 56-85% der Fälle und RET/PTC- Veränderungen festgestellt (87). Dennoch konnten auch RET/PTC- Mutationen in benignen Schilddrüsenknoten nachgewiesen werden, jedoch hier nur in weniger als 45% der Fälle (80, 89-93).

## 2 Aufgabenstellung

Die Arbeit soll einen ersten Einblick in die mögliche Pathogenese und Mutationsmuster von heißen Schilddrüsenknoten bei Kindern und Heranwachsenden ermöglichen. Dies erfolgt durch den retrospektiven Nachweis von somatischen Punktmutationen und Rearrangements in formalinfixierten und paraffinierten Gewebeproben von 33 konsekutiv gesammelten Proben einer polnischen Kinderpopulation.

Folgende Fragestellung wurde in diesem Zusammenhang untersucht:

- Welche TSHR- und Gs $\alpha$ - Mutationen treten in der Kinderpopulation auf und wie ist deren Verteilungsmuster?
- Können somatische BRAF<sub>V600E</sub>-, HRAS-, NRAS-, KRAS- Mutationen ebenso wie PAX8/PPAR $\gamma$ - und RET/PTC1/3- Rearrangements nachgewiesen werden? Lässt sich damit eventuell die erhöhte Malignitätsrate in HTNs von Kindern erklären?
- Gibt es Unterschiede von Mutationsmustern und -häufigkeiten gegenüber HTNs der Erwachsenenpopulation?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patientenkohorte**

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde Histologiematerial von resezierten szintigrafisch heißen Schilddrüsenknoten von 33 Kindern und Jugendlichen analysiert.

Alle Patienten lebten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in West-Polen und wurden in der Abteilung für Pädiatrische Endokrinologie und Rheumatologie der Universität Poznan (Republik Polen) diagnostiziert und behandelt. Das Alter der Kinder reichte von 10 bis 18 Jahren, wobei der Median bei 15,2 Jahren lag. Nur 24 der hier analysierten Patienten sind auch unter den 31 Kindern, welche Niedziela et al. (11) bereits analysierten. Diese Gruppe wurde um weitere konsekutive Fälle ergänzt. Der Grund für diese Neugruppierung ist, dass nicht von allen Patienten der initialen Studie ausreichend histologisches Material für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung stand.

Nur ein Patient wurde vor der Einführung der obligatorischen Iodprophylaxe in Polen, welche ab dem 26. Januar 1997 stattfand, diagnostiziert. Ein weiterer Patient (Nummer 28 Tabelle 2) war aufgrund eines Morbus Hodgkin bereits einer Bestrahlung des Halses ausgesetzt. Der Tumor der SD wurde jedoch erst bei einer Ultraschalluntersuchung vor dem Beginn des Behandlungsprotokolls für Morbus Hodgkin entdeckt und behandelt.

Bei allen Probanden konnte initial mindestens ein neu entdeckter palpabler Knoten der Schilddrüse festgestellt werden (29 Patienten mit solitären Knoten und 4 Patienten mit multiplen Knoten). In 20 Fällen befand sich der Knoten auf der rechten Seite und in 13 Fällen auf der linken. Bei 15 der Patienten zeigten sich klinische Anzeichen für eine Hyperthyreose, welche anschließend laborchemisch bestätigt werden konnte.

Die biochemische Analyse des Blutes ergab insgesamt einen Euthyreodismus (normales TSH, SD-Hormone normal), 11mal eine latente Hyperthyreose (TSH vermindert, SD-Hormone normal) und 14mal eine manifeste Hyperthyreose (TSH vermindert, SD-Hormone erhöht). Die TSH-Bestimmung erfolgte mittels des Ultrasensitiv hTSH II MEIA Kits (Abott Laboratories, USA). Die freien Schilddrüsenhormone (fT3- freies Triiodthyronin; fT4- freies Thyroxin) wurden in Serie mittels entsprechendem kommerziellen Reagenzienkit (Abott Laboratories, USA) ermittelt. Zur weiteren Diagnostik wurden bei 29 Patienten die Autoantikörper der SD bestimmt. Anti- Thyreoglobulin-Antikörper (TG- Ak) und Anti- Thyreoperoxidase- Antikörper (TPO- Ak) wurden entweder in einem ELISA- Ansatz (Biocode S.A., Belgien) oder in einem Radioimmunoassay (Brahms, Deutschland) bestimmt. Bei 4 der Kinder konnten erhöhte Werte an Autoantikörpern nachgewiesen werden (zweimal bei manifestem und einmal bei latenter Hyperthyreose, einmal bei laborchemischem Euthyreodismus). Die jeweiligen Referenzwerte der angegebenen Messmethoden sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1**      **Referenzwerte der klinisch- chemischen Analyten**

<i>Hormonbestimmung</i>	<i>Referenzbereich</i>	
<b>TSH</b>	0,5 - 5,0 µ IU/ml	
<b>ft3</b>	1,68 - 3,54 pg/ml	
<b>ft4</b>	0,71 - 1,85 ng/dl	
<i>Antikörperbestimmung</i>	<i>ELISA</i>	<i>Radioimmunoassay</i>
<b>TG- Ak</b>	<100 IU/ml	<60 IU/ml
<b>TPO- Ak</b>	<50 IU/ml	<60 IU/ml

Zur Evaluierung der klinischen Befunde wurde die Größe der Knoten mittels Ultraschall ermittelt. Es ergaben sich Messwerte zwischen 1,4cm bis 5,4cm Durchmesser (Tabelle 2).

Alle Patienten wurden szintigrafisch untersucht, um die funktionellen Aspekte der Knoten abzuklären. Hierbei wurde Natrium-<sup>99m</sup>Technetium-Per technetat intravenös verabreicht und 20 min nach Gabe wurde ein szintigrafisches Bild mit einer Gammakamera (Gamma camera Nucline TH/33, Mediso Ltd.) erstellt. Keiner der Patienten wurde zuvor mit schilddrüsenhemmenden Medikamenten behandelt. Es wurde bei allen Kindern eine Anreicherung des radioaktiv markierten Materials innerhalb der palpablen Schilddrüsenknoten („heiße Knoten“) festgestellt, wobei in 21 Fällen eine komplette Suppression des umliegenden Gewebes gesehen wurde. In 12 Fällen war jedoch eine teilweise Überstrahlung des restlichen Schilddrüsenorgans erkennbar (inkomplette Suppression).

Nach Diagnosestellung wurden alle Kinder innerhalb der Jahre 1996 - 2008 mittels Lobektomie des betroffenen Schilddrüsenlappens operativ behandelt. Die Patienten, bei denen zuvor erhöhte Schilddrüsenhormonwerte festgestellt wurden, erhielten präoperativ Thiamazol in geringen Dosen, um zumindest einen subklinischen Status der Hyperthyreose präoperativ zu erreichen. Das operativ gewonnene Gewebe wurde in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet, um eine histologische Untersuchung zu ermöglichen.

Die Mikroskopie ergab in 29 Fällen eine benigne Veränderung, in 2 Fällen ein PTC, in einem Fall ein FTC und in einem Fall konnte eine follikuläre Variante eines PTC festgestellt werden. Die histologische Klassifikation der gutartigen Veränderungen erbrachte folgende Ergebnisse: in 6 Fällen wurden hyperplastische Knoten und eine kolloidale Struma nachgewiesen, wohingegen die restlichen 22 Knoten als follikuläre oder oxyphile, adenomatöse Strumen identifiziert wurden. 4 der 22 Adenome wurden als „follikuläre Adenome mit unvorhersehbarer Prognose“ (FAUP) klassifiziert. Alle histologischen Ergebnisse wurden durch einen zweiten Pathologen bestätigt.

Die Befunde werden in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2      Patientenkohorte**

*a) Patienten mit benignen Knoten*

Patient	Geschlecht	Alter bei Diagnose [ Jahre ]	Klinischer Status	Lokalisation	TSH	SD - Hormone	SD - Antikörper	größter Knotendurchmesser [ cm ]	Szintigrafie Suppressionsmuster	Histologische Diagnose
1	F	14	A	L	-	+	N	5,4	komplett	FAUP
2	M	12	N	R	-	+	NA	4,4	komplett	FA
3	F	18	N	R	-	+	N	3,2	komplett	FA
4	F	13	A	R	-	+	N	2,7	komplett	FAUP
5	F	14	A	R	-	N	N	4,0	komplett	AG
6	F	16	N	L	N	N	+	3,3	inkomplett	FA
7	F	17	A	L	-	+	N	2,0	komplett	FA-ox
8	F	14	A	R	N	N	N	4,3	inkomplett	FA-coll
9	F	16	A	R	-	+	N	4,2	komplett	FA
10	F	17	N	R	-	+	NA	3,2	komplett	FAUP
11	F	12	N	L	-	N	NA	3,5	komplett	FA
12	F	14	A	L	-	+	N	4,0	komplett	AG
13	F	15	A	R	N	N	N	1,8	inkomplett	AG
14	F	14	N	L	N	N	NA	3,6	inkomplett	FA
15	F	11	A	R	-	+	N	4,2	komplett	AG
16	F	14	A	L	-	N	N	4,7	komplett	FA-coll
17	M	15	A	R	-	+	+	5,0	komplett	FA
18	F	14	A	L	-	+	+	5,2	komplett	AG
19	F	17	N	R	-	N	N	3,8	inkomplett	FA
20	F	13	N	R	-	N	N	2,1	komplett	FA
21	F	10	N	R	N	N	N	1,4	inkomplett	FAUP
22	M	16	N	R	-	N	+	3,2	komplett	FA
23	F	13	N	R	-	N	N	4,5	komplett	FA
24	F	17	N	R	N	N	N	3,2	inkomplett	FA
25	F	15	A	L	-	N	N	5,1	komplett	FA-ox
26	F	15	N	R	-	N	N	2,6	komplett	FA
27	F	15	N	R	-	+	N	3,3	komplett	AG
28	F	13	N	L	N	N	N	1,6	inkomplett	FA
29	F	15	N	L	-	N	N	4,1	inkomplett	FA



**Tabelle 2          Patientenkohorte (Fortsetzung)**

*b) Patienten mit malignen Schilddrüsenknoten*

Patient	Geschlecht	Alter bei Diagnose [ Jahre ]	Klinischer Status	Lokalisation	TSH	SD - Hormone	SD - Antikörper	größter Knotendurchmesser [ cm ]	Szintigrafie Suppressionsmuster	Histologische Diagnose
30	M	17	N	L	-	N	N	4,2	inkomplett	PTC
31	F	17	N	R	N	N	N	5,0	inkomplett	fvPTC
32	F	14	A	L	-	+	N	3,7	komplett	PTC
33	F	16	A	R	-	+	N	4,2	inkomplett	FTC

*SD - Schilddrüse; F - weiblich; M - männlich; N - normal / innerhalb des Normbereiches; A – auffällig /klinische Anzeichen für Hyperthyreose (z.B. Gewichtsabnahme, Unruhe); L - linker SD- Lappen; R – rechter SD- Lappen; + - erhöht / oberhalb des Normbereiches; - - vermindert / unterhalb des Normbereiches; NA - nicht analysiert; FA - follikuläres Adenom; FAUP – follikuläres Adenom mit unbestimmter Prognose; AG - adenomatöse Struma; FA-ox – oxyphile Variante des follikulären Adenoms; FA-coll – kolloider Typ des follikulären Adenoms; FTC – follikuläres Schilddrüsenkarzinom; PTC – papilläres Schilddrüsenkarzinom; fvPTC – follikuläre Variante des papillären Schilddrüsenkarzinoms*

### **3.2 Nukleinsäure- Isolation**

Die Extraktion der RNA und DNA erfolgte aus ungefärbten, histologischen Schnitten. Das Gewebe war dementsprechend bereits formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Vorgehensweise entsprach bei der RNA- Isolation der bereits publizierten Methode von Ferraz et al. (94) und bei der DNA- Isolation der Methode von Rehfeld et al. (95, 96).

Die Objektträger wurden für 5min in Xylol inkubiert und anschließend für weitere 5min in 96% Ethanol getaucht. Nach der Trocknung der Schnitte bei Raumtemperatur wurden 150µl PKD- Puffer (miRNeasy FFPE Kit, Quiagen) aufgetragen. Mit einem Skalpell wurden die Zellen nun vom Objektträger gelöst und die gesamten 150µl wurden in ein neues Reagenzröhrchen überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 10µl Proteinkinase K und nach dem anschließenden Vortexen eine Inkubation für 15min bei 55°C. Nach erneutem Durchmischen mittels Vortexer erfolgte eine weitere Inkubation bei 80°C für 10min. 320µl RBC- Lyse Puffer (miRNeasy FFPE Kit, Quiagen) wurden hinzugegeben und mit der Probe vermischt. Anschließend wurde die Probe auf eine gDNA elimination spin- Säule (miRNeasy FFPE Kit; Quiagen) überführt und diese bei 8000g für 30s zentrifugiert. Dann wurden 1120µl 96% Ethanol zum Eluat zugegeben und vermischt. Das weitere Vorgehen entsprach dem miRNeasy FFPE Kit Protokoll.

Für die DNA- Extraktion aus der gleichen Probe wurde die genutzte gDNA elimination spin- Säule auf ein neues Tube überführt und 200µl TE- Puffer hinzugegeben. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule bei 8000g für 1min zentrifugiert. Danach wurden dem Eluat 600µl 96% Ethanol und 30µl 3M Natriumazetat hinzugegeben und vermischt. Nachfolgend wurde das Gemisch für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Einer 10minütigen Zentrifugation (8000g) bei Raumtemperatur schloss sich ein Waschschrift des DNA- Pellets mit 70% Ethanol an. Abschließend wurde die gewonnene DNA der Proben in 50µl TE- Puffer gelöst.

### **3.3 cDNA- Synthese**

Zur Generierung von cDNA wurde das miScript Reverse Transcription Kit (Quiagen, Deutschland) entsprechend der Herstellervorgaben eingesetzt.

Dabei wurden 7,5µl der Proben- RNA zu einem vorher hergestellten Master Mix, bestehend aus 2µl 5fach miScript RT- Puffer und 0,5µl miScript Reverse Transkriptase gegeben und anschließend für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die miScript Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 95°C für 5min deaktiviert.

### **3.4 Nachweis von Rearrangements mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Zum Nachweis von Rearrangements der Gene PAX8/PPAR $\gamma$ , RET/PTC1 und RET/PTC3 benutzte man in dieser Studie multiplex- qPCRs mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Quiagen, Deutschland). Zur Kontrolle der cDNA- Synthese wurde jeweils ein intron- spanning Primerpaar zur Generierung eines 125 Basenpaare langen Fragmentes im Bereich des PAX8- mRNA- Fragmentes (Exon 5-6) eingesetzt. Der gleichzeitige Nachweis der Mutation erfolgte über ein parallel hinzugegebenes Rearrangement- spezifisches Primerpaar (Tabelle 3).

Initial erfolgte eine Denaturierung der cDNA durch eine 15minütige Erhitzung auf 95°C. Die jeweils 55 Zyklen umfassende PCR wurde anschließend nach folgendem zweiphasigem Protokoll durchgeführt: 5min Denaturierung bei 95°C, anschließend 60s Annealing / Elongation bei 58°C. Um eine Unterscheidung zwischen dem Kontrollfragment und dem zu untersuchenden Fragment treffen zu können wurde nach Abschluss der PCR eine fluoreszenzbasierte Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Diskriminierung erfolgte aufgrund der spezifischen Schmelzpunkte der jeweiligen PCR- Produkte (Tabelle 3). Als positive Kontrollen dienten bereits getestete und als Mutationsträger bekannte Proben. Diese wurden mittels Big Dye-Terminator Chemie (Applied Biosystems, Deutschland), entsprechend der Herstellerangaben, behandelt und anschließend mittels eines automatischen Sequenzierers ABI 3100 (Applied Biosystems, Deutschland) sequenziert.

### **3.5 Nachweis von Punktmutationen mittels High- Resolution- Melting (HRM)**

BRAF- (Codon 600/601; BRAF<sub>V600E</sub> ), KRAS- (Codon12/13), NRAS- (Codon 61) und TSH- Rezeptor- Mutationen (Exon 9 und 10) wurden mittels Real- Time- PCR und High- Resolution- Melting nachgewiesen. Dafür wurden jeweils Primer generiert (Tabelle 4), welche die mutmaßlichen Mutationen abdecken. Diese Primer kamen zusammen mit dem LightCycler 480 High Resolution Melting Master Mix (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) zur Anwendung. Die Analysen erfolgten auf einem LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) mit herstellerspezifischen Software-Tools.

Für BRAF- , KRAS- und NRAS- Mutationsnachweise erfolgte eine initiale Denaturierung bei 95°C für 10min, gefolgt von 55 Zyklen einer dreiphasigen PCR mit 3s bei 95°C zur Denaturierung, anschließenden 12s bei 58°C (NRAS, KRAS), bzw. 60°C (BRAF) zum Annealing und einer abschließenden Elongation für 10s bei 72°C. Um TSHR- Mutationen nachzuweisen wurde gleichfalls eine initiale Denaturierung bei 95°C für 10min durchgeführt. Eine 55 Zyklen umfassende dreiphasige PCR schloss sich an. Folgende Phasen wurden dabei gewählt: 3s Denaturierung bei 95°C, 10s zum Annealing bei 56°C und eine 10s dauernde Elongation.

Bei beiden Vorgehensweisen schloss sich jeweils eine hoch auflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM) an. Dabei wurde eine schrittweise Erwärmung um 0,02°C pro Sekunde mit 25 Messungen pro Grad Celsius von 75°C bis 95°C gewählt.

**Tabelle 3**      **Primer zum Nachweis von PAX8/PPAR $\gamma$ - und RET/PTC- Rearrangements mittels Multiplex qPCRs.**

Primer Bezeichnung	Primer Sequenz	Primer ( $\mu$ M )	Ampliconlänge ( BP )	Schmelztemperatur des Amplicons ( °C )
<u>Kontrollfragment (PAX8)</u>				
PAX8-E5-F PAX8-E6-R	TCAACCTCCCTATGGACAGC GGAGTAGGTGGAGCCCAGG	0.15 <sup>*</sup> 0.25 <sup>**</sup>	125	84.5
<u>PAX8 (Exon8) / PPAR<math>\gamma</math></u>				
PAX8-E8-F PPAR $\gamma$ -E1-R	TCGACTCACCAGACCTACCC GGAGTGGTCTTCCATTACGG	0.5 0.5	120	81.4
<u>PAX8 (Exon9) / PPAR<math>\gamma</math></u>				
PAX8-E9-F PPAR $\gamma$ -E1-R	CAGGCCCTCCTCTCAGAAAT GGAGTGGTCTTCCATTACGG	0.5 0.5	105	80.4
<u>PAX8 (Exon10) / PPAR<math>\gamma</math></u>				
PAX8-E10-F PPAR $\gamma$ -E1-R	CTATGCCTCCTCTGCCATC GGAGTGGTCTTCCATTACGG	0.5 0.5	124	81.8
<u>RET/PTC1</u>				
RET/PTC1-F RET/PTC1-R	TGCAGCAAGAGAACAAGGTG CCAAGTTCTTCCGAGGGAAT	0.5 0.5	144	83.1
<u>RET/PTC3</u>				
RET/PTC3-F RET/PTC3-R	CAGGACTGGCTTACCCAAAA TCCAAATTCGCCTTCTCCTA	0.5 0.5	114	78.8

\* - zum Nachweis von RET/PTC1+3, PAX8-E10 / PPAR $\gamma$ ; \*\* - zum Nachweis von PAX8-E8 / PPAR $\gamma$ , PAX8-E9 / PPAR $\gamma$

**Tabelle 4**      **Primer zum Nachweis von BRAF- / KRAS- / NRAS- und TSHR- Mutationen**  
**mittels High Resolution Melting-qPCR**

Primer Bezeichnung	Primer Sequenz	Primer Konzentration ( µM )	Ampliconlänge ( BP )
<b><u>BRAF</u></b>			
BRAF-F BRAF-R	GGTGATTTTGGTCTAGCTACAG GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA	0.5	126
<b><u>KRAS</u></b>			
KRAS-F KRAS-R	GGCCTGCTGAAAATGACTGA GCTGTATCGTCAAGGCACTCT	0.5	79
<b><u>NRAS</u></b>			
NRAS-F NRAS-R	TGGTGAAACCTGTTTGTGG TCGCCTGTCCTCATGTATTG	0.5	87
<b><u>TSHR exon 9</u></b>			
TSHR-IX-F TSHR-IX.1-R	TCATCTCCCAATTAACCTCAGG AGCAGTGGCTTGGGTAAGAA	0.5	261
TSHR-IX.2-F TSHR-IX-R	CCTTGAGTTTCCTTCACCTCA GCTTCCAATTTCTCTCCAC	0.5	203
<b><u>TSHR exon 10</u></b>			
TSHR-X-1-F TSHR-X-1.1-R	TGGCACTGACTCTTTTCTGT CCAAAACCAATGATCTCATCC	0.5	249
TSHR-X-1.2-F TSHR-X-1-R	GGGTACAAGGAAAAGTCCAAG TTCTCAGGAACCTGTAGCC	0.5	250
TSHR-X-2-F TSHR-X-2.1-R	AAGTCCGATGAGTTCAACC GCGATGAGGAGCAGGTACA	0.5	212
TSHR-X-2.1-F TSHR-X-2-R	TCTCCTCACCAGCCACTACA TGACCGTCAGCGTATACACCG	0.5	230
TSHR-X-3A-F2 TSHR-X-3A-R2	AACACGGCTGGTTTCTTCAC TATTCACCAAAGGAAGCA	0.5	198
TSHR-X-3B-F TSHR-X-3B-R	CACGCATGTGCCATCATGGT TTCACATAACAGCAGCAGACG	0.5	200
TSHR-X-4-F TSHR-X-4-R	TGACGCTCAACATAGTTGCC AGAGGAATGGATTGGCACAG	0.5	273
TSHR-X-4.1-F TSHR-X-4.1-R	AGTCCGAAATCCGCAGTACA TTCAGAATTGCTGACAGAGCA	0.5	129
TSHR-X-4.2-F TSHR-X-4.2-R	ATATGCATGGCCCCAATCT AGGCCTTGGTGAAAATAGCA	0.5	151
TSHR-X-5-F TSHR-X-5.1-R	GTCAGCAATTCTGAACAAGCC TGCTGTTCTTTGGAGGAACC	0.5	215
TSHR-X-5.2-F TSHR-X-5-R	CTCAGCAAGTTTGGCATCTG GTTCCCCTACCATTGTGAGTAG	0.5	253

### 3.6 Nachweis von Punktmutationen mittels Pyrosequenzierung

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Mutationsdetektion mittels PCR und anschließender HRM von BRAF-, KRAS- und NRAS- Mutationen wurde zusätzlich eine Pyrosequenzierung durchgeführt. Dazu wurde der Therascreen BRAF Pyro Kit, der Therascreen NRAS Pyro Kit und der PyroMark KRAS Kit (Quiagen, Deutschland) genutzt und nach den angegebenen Instruktionen vorgegangen. Die Verifizierung der HRAS- Mutationen erfolgte ebenfalls mittels Pyrosequenzierung, jedoch kamen hierbei selbst designte Primer (Tabelle 5) unter Verwendung folgenden Protokolls zum Einsatz (95): 5µl der genomischen DNA wurden jeweils in einer PCR mit Template spezifischen, biotinylierten Primern verwendet. Anschließend wurde das PCR- Produkt mittels Streptavidin Sepharose Beads (GE Healthcare, Deutschland) immobilisiert und Einzelstrang- DNA vorbereitet, um nachfolgend das Annealing des Sequenzierprimers zu ermöglichen. Dann wurde die geprimte DNA wieder von der Streptavidin- Oberfläche gelöst und mittels Pyro Mark Q24 (Quiagen, Deutschland) pyrosequenziert.

Auch TSHR- Punktmutationen der Positionen c.281, c.453, c.538 und der Polymorphismus an Position c.727 konnten mittels Pyrosequenzierung verifiziert werden. GNAS- Punktmutationen wurden an Position c.210 und c.227 ebenfalls mit selbst designten Primern untersucht. Die vorgeschaltete PCR setzte sich hierbei aus einer 15minütigen Denaturierung bei 95°C und 42 nachfolgenden Zyklen zusammen: 20s Denaturierung bei 95°C, 30s Primer- Annealing bei 60°C und 30s Elongation bei 72°C. Die anschließende Pyrosequenzierung erfolgte nach der obigen Beschreibung.

**Tabelle 5**      **Primer zum Nachweis von TSHR- / Gsa- / HRAS- Punktmutationen**  
mittels Pyrosequencing

Primer Bezeichnung	Primer-Sequenz	Primer Konzentration ( $\mu$ M )	Ampliconlänge ( BP )
<b><u>TSHR</u></b>			
TSHR-IX-PS-F2 TSHR-IX-PS-BR TSHR-281-Pyro	GGGACGTGTCTCAAACCAGT Bio-GTCCCTGCCACTTACCCTCT GGCTGACCTTTCTTACC	0.5	205
TSHR-X-2-F TSHR-X-2.1-BR TSHR-M453T-Pyro	AAGTCCGATGAGTTCAACC Bio-GCGATGAGGAGCAGGTACA ACGTCCCCGCTTTC	0.5	212
TSHR-X-3A-F2 TSHR-X-3A-BR2 TSHR-A538T-Pyro	AACACGGCTGGTTTCTTCAC Bio-TATTCCTCCACCAAGGAAGCA AAGATCCGCCTCAGG	0.5	198
TSHR-X-5.2-F TSHR-X-5.2-R TSHR-D727E-Pyro	CTCAGCAAGTTTGGCATCTG TGAGATTTGGCCTTGCTTCT CAAAAGGTTACCCACG	0.5	192
<b><u>GNAS</u></b>			
GNAS-201-F GNAS-201-BR GNAS-R201X-Pyro	GTTTCGGTTGGCTTTGGTGAG Bio-CCACCTGGAACCTGGTCTCAA AGGACCTGCTTCGCT	0.5	105
GNAS-227-BF GNAS-227-R GNAS-Q227X-Pyro2	Bio-CCCAGTCCCTCTGGAATAACC ACAGCATCCTACCGTTGAAGC TTGCGGCGTTCATCG	0.5	113
<b><u>HRAS</u></b>			
HRAS-F HRAS-R HRAS-Seq	TAGAGGATTCCTACCGGAAGCA GCATGGCGCTGTACTCCT TCCTGGATACCGCCG	0.3	96

### **3.7 Funktionelle Charakterisierung der TSHR- Mutation A538T**

#### **3.7.1 Zielgerichtete Mutation**

Die Generierung von TSHR- Mutanten erfolgte nach einer bereits von Müller et al. (96) publizierten Methode. Anbei eine kurze Zusammenfassung:

Die TSHR- Mutanten wurden wie von Jäschke et al. (97) beschrieben, mittels PCR- Mutagenese erstellt, indem man den TSHR- pcDNA3.1 (-) / hygro- Vektor als Vorlage nutzt. Die Bestätigung mutierter TSHR- Sequenzen erfolgte durch Dideoxy- Sequenzierung mit Big Dye- Terminator Chemie (Applied Biosystems, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben auf einem automatischen ABI 3100 Sequenzierer (Applied Biosystems, Deutschland).

#### **3.7.2 Zellkultur und Expression der TSHR- Mutation**

Die Kultivierung der COS-7- Zellen erfolgte in stark glucosehaltigem Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, PAA Laboratories, Österreich) mit zusätzlich 10% FCS,  $10^5$  U/l Penicillin und 100mg/l Streptomycin (Gibco Life Technologies, UK) bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>- Atmosphäre.

HEK<sub>GT</sub> 293- Zellen (Invitrogen Group, UK) wurden gleichfalls in stark glucosehaltigem Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), dem 10% FCS, 1% nichtessentielle Aminosäuren (PAA Laboratories, Österreich),  $10^5$  U/l Penicillin, 100mg/l Streptomycin und 1% Geneticin (Gibco Life Technologies, UK) zugesetzt waren, bei identischen Bedingungen kultiviert.

Die Zellen wurden in 12- Well- Platten (mit einer Einsaatdichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well für COS-7 und  $1,4 \times 10^5$  Zellen pro Well für HEK<sub>GT</sub>293) oder 24- Well- Platten (mit einer Einsaatdichte von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro Well für COS-7 und  $0,7 \times 10^5$  Zellen pro Well für HEK<sub>GT</sub>293) mit entweder 1µg beziehungsweise 0.5µg DNA je Well mittels GeneJammer® Transfection Reagent (Stratagene, Niederlande) transfiziert.

#### **3.7.3 FACS- Analyse**

Die Ermittlung der Zellexpression des TSHR erfolgte mittels FACS- Flow- Zytometer semiquantitativ. Anschließend wurden die transfizierten und suspendierten Zellen mit PBS, welchem BSA (1%) zugesetzt war, gewaschen und danach bei 4°C für 30min zusammen mit einer 1:400 Verdünnung eines Maus- anti-human- TSHR- Antikörpers (2C11, 10mg/l, Serotec Ltd., UK) inkubiert. Daran schlossen sich zwei weitere Waschschrte und abschließend eine Inkubation mit einem 1:400 verdünnten Alexa Fluor 488 konjugiertem Ziegen-anti-mouse-IgG (Invitrogen, USA) bei 4°C für 30min an. Direkt vor der FACS- Analyse wurden die Zellen wiederum zweimal gewaschen und danach mit Paraformaldehyd (1%) fixiert. Als Parameter für die Rezeptorexpression wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität gewählt. Der Wildtyp- TSHR- Wert wurde als 100%- Wert gesetzt und die



Mutanten dazu ins Verhältnis gebracht. Die Effektivität der Transfektion konnte durch die Anzahl an fluoreszenz- positiven Zellen dargestellt werden und betrug bei jeder der Mutanten 50-60% der lebenden Zellen.

#### **3.7.4 cAMP- Akkumulationsassay**

Die Bestimmung der intrazellulären cAMP- Spiegel erfolgte nach der von Müller et al. (96) publizierten Methode.

Die transfizierten Zellen wurden in 24- Well- Platten kultiviert und 48h nach der Transfektion begann im Beisein bzw. in Abwesenheit von 100mU/ml bTSH (Sigma, Deutschland) im serumfreien Medium mit 1mM IBMX (Sigma, Deutschland) die 1h dauernde Inkubation. Die Beendigung der Zellreaktion erfolgte durch die anschließende Medientfernung. Ein Waschschriff mit eiskaltem PBS schloss sich an und danach erfolgte die Zelllyse mittels 0,1N Salzsäure. Die Überstände wurden gesammelt und getrocknet. Die Bestimmung des cAMP- Gehalts geschah mittels eines AlphaScreen Assays (PerkinElmer, USA) entsprechend der Herstellerangaben.

#### **3.7.5 IP- Akkumulationsassay**

Die Bestimmung der intrazellulären Inositolphosphat- Level wurde analog der von Jäschke et al. (98) bereits publizierten Vorgehensweise durchgeführt.

Die transfizierten COS-7- Zellen wurden mit 2µCi [myo-<sup>3</sup>H]-Inositol (Amersham Biosciences, Deutschland) für 6h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit serumfreiem DMEM mit 10mM Lithiumchlorid und 100mU TSH/ml stimuliert. Die Auswertung der basalen und TSH- induzierten Anstiege des intrazellulären Inositolphosphat- Levels erfolgte durch Anionen- Austausch- Chromatographie wie von Berridge et al. beschrieben (99).

#### **3.7.6 Lineare Regressionsanalyse (LRA)**

Die konstitutive Aktivität des Rezeptors kann als Ausdruck der basalen cAMP- Bildung in Abhängigkeit zur Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche im FACS angesehen werden. COS-7- und HEK<sub>GT</sub>293- Zellen wurden in 24- Well- Platten mit steigenden Konzentrationen von Wildtyp- oder mutierter TSHR- Plasmid- DNA (50, 100, 200, 300, 400 und 500ng pro Well) transfiziert.

Um eine konstante Menge an DNA von jeweils 500ng in die Zellen einzuschleusen wurde ein leeres Vektor-Plasmid mit entsprechender Menge zusätzlich zu der Wildtyp- oder mutierten DNA hinzugegeben. Die Transfektionseffizienz betrug bei den lebenden Zellen circa 50-60%. Damit man die basale cAMP- Bildung als Ableitung der Rezeptorexpression darstellen kann wurde das lineare Regressionsmodul von GraphPad Prism 4.0 für Windows benutzt.

### 3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t- Test in GraphPad Prism 4.0 für Windows. Hierbei gilt:  $p < 0,001$  extrem signifikant,  $p < 0,01$  hoch signifikant,  $p < 0,05$  signifikant.

### 3.9 Datenbankrecherche

Zur Erhebung von Falldaten wurden 3 Datenbanken herangezogen.

Bei der ersten Datenbank handelt es sich um den „Catalogue of Somatic Mutation in Cancer“ (COSMIC- Datenbank des Sanger Institute (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>)). Sie umfasst die Sammlung aller bekannten, in menschlichen Tumoren vorkommenden, genetischen Veränderungen. Hierbei wurde unter dem Stichwort „TSHR“ nach allen gelisteten Referenzen gesucht, welche in Schilddrüsengewebe gefunden werden konnten. Diese Suche erbrachte 290 Treffer.

Als Referenz mit besonderem Fokus auf Mutationen des TSHR wurde die Datenbank des Universitätsklinikums Leipzig (<http://www.tsh-receptor-mutation-database.org>) nach TSHR-Mutationen von hyperthyreoten Patienten durchsucht (379 Fälle).

Zur Vervollständigung der jeweils gefundenen Daten und um möglichst aktuelle Ergebnisse mit einzubeziehen erfolgte die Recherche in der PubMed- Datenbank mit folgenden Suchbegriffen (in verschiedenen Kombinationen): Hyperthyreoidism, Thyroid Cancer, Thyroid Nodule, Children, Adolescent, Hot Nodule, TSHR.

Die letztmalige Datenbankanalyse für die vorliegende Auswertung erfolgte Ende Juli 2014.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mutationsanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 33 szintigrafisch heiße Knoten von Kindern und Jugendlichen auf TSHR-, GNAS-, HRAS-, KRAS-, NRAS- und BRAF- Mutationen untersucht. Darüber hinaus wurden die Knoten auf PAX8/PPAR $\gamma$ -, RET/PTC1- und RET/PTC3- Rearrangements analysiert. Alle Ergebnisse der Mutationsanalyse sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefasst.

In 20 der 33 analysierten heißen Knoten konnten TSHR- Mutationen (sowohl stille als auch rezeptor-aktivierende Mutationen) nachgewiesen werden, womit sich eine Prävalenz von 61% ergab. Alle gefundenen Mutationen waren heterozygot.

Bei der in den benignen Knoten am häufigsten auftretenden TSHR- Mutation handelt es sich um die M453T- Punktmutation, welche durch einen Basenaustausch eines Thymins zu Cytosin charakterisiert wird und in 8 von 18 mutationspositiven benignen Knoten (44%) nachgewiesen werden konnte. Die Mutationen D633Y und T632I konnten jeweils zweimal in autonomen Adenomen gefunden werden. Fünf weitere Punktmutationen (S281N, A538T, I568T, D633H, V656F) traten singulär auf. Sieben der genannten Mutationen wurden bereits früher in Fallstudien bei hyperthyreoten Patienten beschrieben. Die A538T- Mutation, die durch einen Guanin zu Adenosin Austausch gekennzeichnet ist, wurde bisher noch nicht beschrieben und konnte erstmalig detektiert werden. Weiterhin konnten drei stille Mutationen (A455A, L645L; Y706Y) erfasst werden, wobei eine davon zusammen mit einer M453T- Mutation auftrat (Patient Nr. 1).

In den untersuchten 4 malignen heißen Knoten wurde in einem Fall eine T632I- Mutation nachgewiesen.

Alle Fälle, in denen keine TSHR- Mutation nachweisbar war, wurden anschließend auf die bekannten konstitutiv aktivierenden Gs $\alpha$ - Mutationen in den Positionen c.201 und in Position c.227 untersucht. Es konnte jedoch weder in Position c.201 noch in Position c.227 eine Mutation gefunden werden.

Die Untersuchung des TSHR- Polymorphismus mit dem Aminosäureaustausch D727E ergab in 10 benignen Knoten ein positives Ergebnis. Zweimal konnte die Mutation homozygot und in den anderen 8 Fällen heterozygot nachgewiesen werden, wobei in 5 Fällen zusätzlich eine somatische TSHR- Mutation auftrat.

Die weitere Mutationsanalyse ergab eine NRAS- Mutation in einem benignen Knoten, die zusammen mit einer M453T- Mutation im TSHR auftrat. Andere Punktmutationen wurden weder im BRAF- Gen noch in anderen RAS-Genen (HRAS und KRAS) gefunden.

Im Rahmen der Untersuchung der 33 heißen Knoten auf PAX8/PPAR $\gamma$ -, RET/PTC1- und RET/PTC3- Rearrangements konnte ein PAX8/PPAR $\gamma$ - Rearrangement in einem heißen PTC aufgezeigt werden. RET/PTC1- oder RET/PTC3- Rearrangements wurden jedoch nicht detektiert.

**Tabelle 6** Mutationsanalyse der benignen Knoten

Patient	Histologische Diagnose	p.TSHR	p.TSHR Polymorphismus	weitere Mutation
1	FAUP	M453T / L645L	WT	WT
2	FA	M453T	D727E	WT
3	FA	M453T	D727E	WT
4	FAUP	M453T	WT	NRAS
5	AG	M453T	WT	WT
6	FA	M453T	WT	WT
7	FA-ox	M453T	WT	WT
8	FA-coll	M453T	WT	WT
9	FA	T632I	WT	WT
10	FAUP	T632I	WT	WT
11	FA	D633Y	D727E	WT
12	AG	D633Y	WT	WT
13	AG	S281N	D727E	WT
14	FA	A459A	WT	WT
15	AG	A538T	WT	WT
16	FA-coll	I568T	WT	WT
17	FA	D633H	WT	WT
18	AG	V656F	WT	WT
19	FA	Y706Y	D727E	WT
20	FA	WT	D727E	WT
21	FAUP	WT	D727E	WT
22	FA	WT	D727E	WT
23	FA	WT	D727E	WT
24	FA	WT	D727E	WT
25	FA-ox	WT	WT	WT
26	FA	WT	WT	WT
27	AG	WT	WT	WT
28	FA	WT	WT	WT
29	FA	WT	WT	WT

**Tabelle 7** Mutationsanalyse der malignen Knoten

Patient	Histologische Diagnose	p.TSHR	p.TSHR Polymorphismus	weitere Mutation
30	PTC	T632I	WT	WT
31	fvPTC	WT	WT	PAX8/PPAR $\gamma$
32	PTC	WT	WT	WT
33	FTC	WT	WT	WT

WT – Wildtypform des Genoms; FA – follikuläres Adenom; FAUP – follikuläres Adenom mit unbestimmter Prognose; AG-adenomatöse Struma; FA-ox – oxyphile Variante des follikulären Adenoms; FA-coll – kolloider Typ des follikulären Adenoms; FTC – follikuläres Schilddrüsenkarzinom; PTC – papilläres Schilddrüsenkarzinom; fvPTC – follikuläre Variante des papillären Schilddrüsenkarzinoms

## 4.2 Funktionelle Charakterisierung der neu identifizierten TSHR-Mutation A538T

Die funktionelle Charakterisierung dieser Mutation erfolgte in transient transfizierten Zellsystemen von HEK<sub>GT</sub>- und COS-7- Zellen. Dabei wurden sowohl die Aktivierung des Gs- als auch des Gq-gekoppelten Signaltransduktionsweges des TSHR analysiert. Als Negativkontrollen wurden leere Vektoren in transfizierten Zellen eingebracht und diese anschließend ebenfalls zu Vergleichszwecken analysiert. Alle Ergebnisse wurden in voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt und doppelt bestätigt.

Es konnte in HEK<sub>GT</sub>- Zellen keine signifikante Verminderung oder Erhöhung der extrazellulären Rezeptorexpression gegenüber dem Wildtyp- TSHR (A538T- TSHR:  $100 \pm 8\%$ ) festgestellt werden. In COS-7- Zellen konnte eine geringere, aber dennoch signifikant verminderte, Expression des mutierten Rezeptors (A538T-TSHR:  $85 \pm 4\%$ ) nachgewiesen werden (Tabelle 8). Eine basale cAMP- Erhöhung, wie bei heißen Knoten anzunehmen, konnte jedoch in beiden Zellmodellen nicht detektiert werden. Das Gegenteil, ein erniedrigtes basales cAMP- Level der A538T- Mutante im Vergleich zur wildtypischen Variante des Rezeptors, war der Fall (Tabelle 8). Zum Ausschluss eines expressionsabhängigen Phänomens des Rezeptors an der Zelloberfläche und damit einer Fehlinterpretation wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Diese ergab jedoch ebenfalls keine signifikante Erhöhung der basalen cAMP- Konzentration im Vergleich zum Wildtyp- System (Abbildung 1). Somit konnte in vitro keine funktionelle Beeinträchtigung des Gs- Signalweges durch die TSHR- Mutation A538T erfasst werden.

Auch im IP- Akkumulationsassay konnten keine Unterschiede gegenüber dem Wildtyp- TSHR festgestellt werden (Tabelle 8). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass in vitro keine Veränderung des Gq- abhängigen Signalweges vorliegt. Auffällig war jedoch die signifikant reduzierte Antwort im Gq- Signalweg des veränderten Proteins auf die Stimulation mit rekombinanten humanen TSH. Hierbei konnten nur 50% des normalerweise auftretenden TSH- Signals nachgewiesen werden (Tabelle 8).

Tabelle 8

## Ergebnisse der Funktionsbestimmung der neu publizierten Mutation A538T

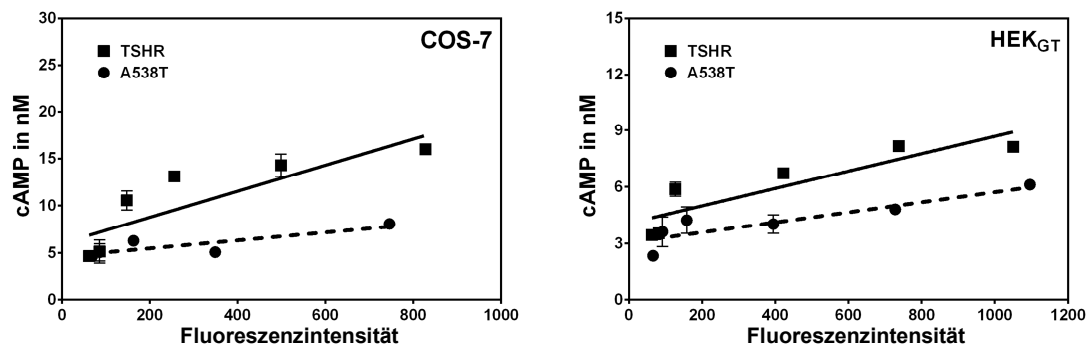
COS-7	Konstrukt	Expression an Zelloberfläche	cAMP- Akkumulation			IP- Akkumulation	
			Basal (nM)	100mU/ ml rhTSH (nM)	LRA (slope)	Basal (nM)	100mU/ ml rhTSH (nM)
	pcDNA	3 ± 1	1,8 ± 0,3	2,2 ± 0,4	-	2,6 ± 0,4	2,7 ± 0,1
	wt-TSHR	100	7,5 ± 0,6	68,0 ± 2,4	1	2,4 ± 0,1	20,6 ± 2,2
	A538T-TSHR	85 ± 4	2,8 ± 0,4	62,2 ± 5,4	0,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	7,3 ± 0,9

HEK <sub>GT</sub> 293	Konstrukt	Expression an Zelloberfläche	cAMP- Akkumulation			IP- Akkumulation	
			Basal (nM)	100mU/ ml rhTSH (nM)	LRA (slope)	Basal (nM)	100mU/ ml rhTSH (nM)
	pcDNA	2 ± 1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	-	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2
	wt-TSHR	100	7,5 ± 0,8	149,3 ± 4,5	1	1,3 ± 0,2	20,9 ± 2,0
	A538T-TSHR	100 ± 8	1,4 ± 0,4	139,1 ± 10,3	0,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2	9,6 ± 0,4

COS-7- und HEK<sub>GT</sub> - Zellen wurden mit wildtypischen TSHR- oder mutierten TSHR-Genen transfiziert.. Der Vektor pcDNA3.1(-)/ Hygromycin wurde als Negativkontrolle eingesetzt. TSH- vermittelte Level von cAMP und IP wurden nach der Behandlung mit 100mU/ml rekombinantem TSH bestimmt. Die Expression von wildtypischem oder mutiertem TSHR wurde mittels FACS- Zytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Durchschnittswert ± Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei bei jedem einzeln eine Doppelbestimmung erfolgte.

Abbildung 1 LRA- Analyse



Die konstitutive Aktivität der LRA- Analyse wurde bestimmt für den Gs- und nicht für den Gq- Signalweg. Geschuldet ist dies der Tatsache, dass der wildtypische TSHR kein erhöhtes basales Level für den Gq- Signalweg aufzeigt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment mit den Rohdaten für das cAMP- versus Expressions- Level (slope) für beide eingesetzten Zellsysteme.

### 4.3 Vergleich mit Literaturdaten

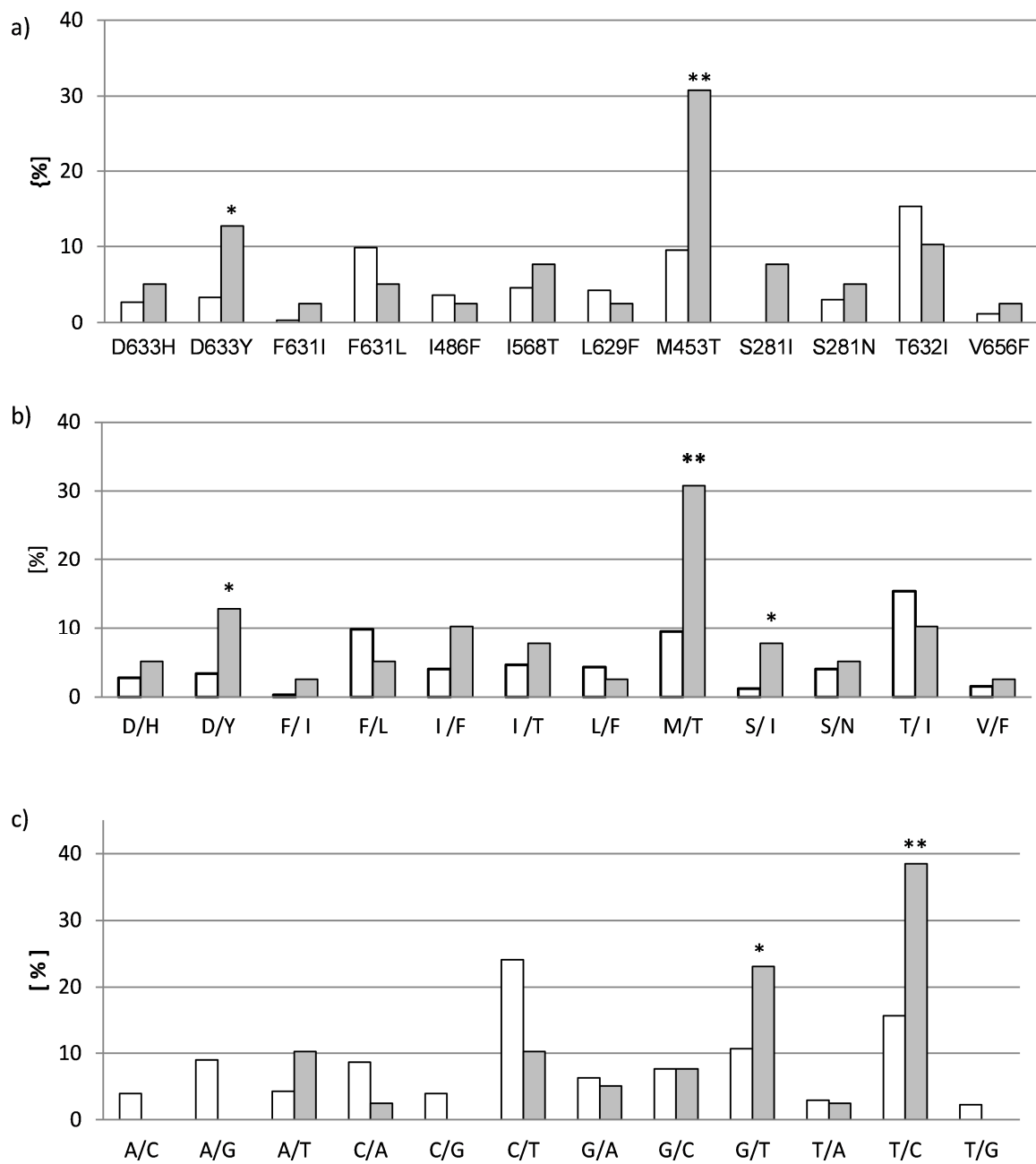
Die 17 Fälle von Kindern mit szintigrafisch heißen benignen Knoten und einer TSHR- Mutation aus dieser Studie wurden mit anderen bereits publizierten Fällen aus hyperthyreoten Patienten, basierend auf den Daten der TSHR- Datenbank des Uniklinikums Leipzig (<http://www.tsh-receptor-mutation-database.org>), verglichen. In ihr fanden sich noch weitere 24 Fälle von Kindern und Jugendlichen (jünger als 25 Jahre) mit spontanen somatischen Mutationen des TSH- Rezeptors (Tabelle 9). Ergänzt man die Fälle um die gelisteten 17 sporadischen Keimbahnmutationen aus der TSHR- Datenbank erhält man ein Kontingent von 58 heißen Knoten von Patienten unter 25 Jahren mit mindestens einer TSHR- Mutation. Aus der gleichen Datenbank konnten 326 erwachsene Patienten (älter als 25 Jahre) mit beschriebener sporadischer TSHR- Mutation und Hyperthyreose als Vergleichskohorte gefunden werden.

Im direkten Vergleich fiel auf, dass die TSHR- Mutation M453T in Jugendlichen mit somatischen TSHR- Mutationen (30,8% der Fälle) signifikant häufiger als in Erwachsenen auftritt (9,5% der TSHR-Mutationen;  $p=0,0006$ ; Abbildung 2a). Auch wenn man Kinder mit sporadischer Keimbahnmutation in die Vergleichsgruppe mit einbezieht vermindert sich die Signifikanz nur geringfügig ( $p=0,0026$ ).

Auch der durch die Mutation bedingte Austausch der Aminosäure Methionin zu Threonin ist in Jugendlichen signifikant häufiger als im erwachsenen Vergleichskollektiv ( $p=0,0006$ ; Abbildung 2b). Ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin bewirkt jedoch auch andere TSHR- Veränderungen außer die M453T- Mutation. 80% der Basenaustausche von Thymin zu Cytosin bei Jugendlichen und Kindern sind durch M453T- Mutationen allein verursacht, dennoch ist der Unterschied weiterhin hoch signifikant ( $p=0,0012$ ; Abbildung 2c). Innerhalb der Erwachsenen- Kohorte sind sogar nur 66% der Thymin zu Cytosin- Austausche dadurch bedingt, weil auch hier, wie bei den Jugendlichen, I568T- und F631L- Mutationen die gleiche Basenveränderung bewirken.

Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Erwachsenen und Heranwachsenden bei der TSHR- Mutation D633Y festgestellt werden (Abbildung 2). In diesem Fall war die Mutation ebenso bei Kindern deutlich häufiger anzutreffen ( $p=0,02$ ). Der zugehörige Basenaustausch fiel in der Signifikanz etwas geringer aus ( $p=0,032$ ), da auch die Mutation V656F auf diesem Austausch basiert.

**Abbildung 2 Vergleich von Kinder- und Erwachsenenpopulation**



Vergleich TSHR- Mutationen und Aminosäure- und Basenaustausche von somatischen Mutationen von Kindern bzw. Heranwachsenden (<25Jahre) und Erwachsenen in benignen heißen Schilddrüsenknoten

- a) TSHR- Mutation
- b) Aminosäureaustausch
- c) Basenaustausch

Basierend auf der TSHR- Datenbank (<http://www.tsh-receptor-mutation-database.org>) und diesen Ergebnissen;  
 \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , graue Säulen – Heranwachsende; weiße Säulen – Erwachsene;  
 nur Veränderungen die Kinder bzw. Heranwachsende und Erwachsene betreffen sind dargestellt



Ein Vergleich der malignen heißen Knoten von Kindern ist aufgrund der geringen Fallzahlen nicht möglich. Bei bisher nur 2 beschriebenen Karzinomen traten TSHR- Mutationen auf. Dabei handelt es sich um einen Fall von einer T632I- Mutation in dieser Studie und ein beschriebener Fall einer M453T- Mutation bei Mircescu et al. (100).

Bei der Vergleichsuntersuchung von heißen Schilddrüsenknoten war ebenfalls eine signifikante Häufung der A632S- Mutation ( $p=0.00045$ ) in malignen Veränderungen gegenüber allen benignen Knoten (Kinder- und Erwachsenenpopulation jeweils zusammengekommen) auffällig.

## 5 Diskussion

Innerhalb der untersuchten Kohorte konnten in den 33 Patienten insgesamt 21 TSHR- Mutationen (inklusive 3 stille Mutationen) erfasst werden. Damit ergab sich insgesamt eine Inzidenz an TSHR-Veränderungen von 63,6%. Darunter waren 17 Aminosäureaustausche bei benignen Knoten (18 von 29; 62,1%), und eine Veränderung der Aminosäuresequenz in einem malignen Knoten. In den wenigen anderen publizierten Fällen von Kindern und Heranwachsenden (< 25Jahre) mit TSHR-Mutationen (Tabelle 9 und Tabelle 10) war die Ermittlung von Inzidenzen aufgrund der geringen Fallzahlen nicht möglich. Zwar gibt es durchaus Studien, in welchen Fallzahlen von bis zu 5 nachgewiesenen Basenaustauschen im TSHR- Gen (47) vorgestellt werden, jedoch wurde hierbei keine Kohortenanalyse durchgeführt, wodurch eine Inzidenz für Rezeptormutationen bei Kindern bisher nicht ermittelt werden konnte.

Diese Studie stellt somit den ersten statistisch validen Bericht über Häufigkeiten von TSHR-Mutationen bei Kindern dar.

**Tabelle 9** Fälle von heißen benignen Schilddrüsenknoten in Kindern und Heranwachsenden (< 25 Jahre) mit nachgewiesener somatischer TSHR- Mutation

Referenz	Anzahl pos. Fällen	Alter	Detektierte TSHR-Mutationen	Andere untersuchte Mutationen
Kopp et al.; 1997 (101)	1	Neugeborenes	S281I	
Parma et al.; 1997 (5)	4	14 – 23y	I486F, 2x I568T, F631L	Gsa negativ
Gozu et al.; 2005 (102)	2	18 – 20y	D633H, L629F	Gsa und PKA negativ
Gozu et al.; 2006 (103)	1	24y	F631L	TSHR D727E und Gsa negativ
Kraemer et al.; 2009 (104)	1	3y	M453T	
Nishihara et al.; 2009 (105)	3	22 – 23y	2x M453T, S281N	Gsa negativ
Schwab et al.; 2009 (47)	5	9 – 16y	T632I, S281I, I568F, D633Y, D633H	Gsa: 1xQ227H
Kohn et al.; 2009 (106)	1	9 Monate	D633Y	
Sancak et al.; 2011 (107)	1	21y	F631I	TSHR D727E und Gsa negativ
Nanba et al.; 2012 (108)	1	8y	S281I	
Agretti et al.; 2013 (6)	2	unbekannt	I568F, M453T	Gsa negativ
Grob et al.; 2014 (109)	2	4 – 8y	2x D633H	
diese Studie	17	10 – 18y	8x M453T, 2x T632I, 2x D633Y, S281I, I568T, D633H, V656F, A538T	<u>positiv</u> 10x TSHR D727E, 1x NRAS; <u>negativ</u> BRAF, PAX8/PPAR $\gamma$ , RET/PTC1+3 und Gsa

**Tabelle 10** Fälle von heißen malignen Schilddrüsenknoten in Kindern und Heranwachsenden (< 25 Jahre) mit nachgewiesener somatischer TSHR- Mutation

Referenz	Anzahl pos. Fällen	Alter	Detektierte TSHR-Mutationen	Andere untersuchte Mutationen
Mircescu et al.; 2000 (100)	1	11y	M453T	<i>positiv</i> 1x PAX8/PPAR $\gamma$
diese Studie	1	17y	T632I	<i>negativ</i> BRAF, RAS (H-,N-, K-), RET1+3/PTC, TSHR D727E, Gsa

Vergleicht man die Häufigkeiten jedoch mit denjenigen, die bei Erwachsenen erhoben werden konnten, so stellt man fest, dass sie sich durchaus im bisher üblichen Rahmen von Mutationshäufigkeiten (38-82%) (5, 38, 39, 41-46, 103) befinden. In adulten Populationen konnten Inzidenzen von 8-86% (59, 110) ermittelt werden. Jedoch wird hier eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die gewählte Untersuchungsmethode und die vorherrschende Versorgung mit Jod angenommen, welche zu diesen starken Schwankungsbreiten führen (102). Es kann angenommen werden, dass auch bei juvenilen Patientengruppen ähnliche Einflussfaktoren eine Rolle spielen könnten.

So werden sensitivere Methoden, wie zum Beispiel die Denaturierungsgradientengelelektrophorese (DGGE), mutmaßlich mehr Mutationen detektieren (111) und somit zu einer höheren Inzidenz führen. Die Verfahren PCR mit HRM und anschließendem Pyrosequenzierung sollten in dieser Kombination mit einer sehr großen Sicherheit Mutationen detektieren können. Weiterhin ist entscheidend, ob die gesamte TSHR- DNA oder nur bestimmte Exons gezielt nach Mutationen gescannt worden sind. Durch eine vollständige Untersuchung des gesamten DNA- Abschnittes der TSHR- DNA wurde versucht, bei dieser Studie die falsch negativen Befunde möglichst auszuschließen.

Jedoch ist aufgrund der starken Fragmentierung der DNA bei Paraffin- eingebetteten Material mit einem höheren Anteil an falsch negativen Proben (112) auch bei dieser Studie zu rechnen. Durch geringe Fallzahlen, kombiniert mit nicht konsekutiver Probensammlung, könnte ebenfalls ein nicht bestimmter Bias verursacht worden sein. Bei der vorliegenden Probenanzahl und der gewählten Probensammlung ist dennoch von einem annähernd realistischeren Abbild der Ist-Situation auszugehen. Auch beeinflusst die Art des Probenmaterials die Häufigkeit von TSHR- Mutationen. In einzelnen heißen Knoten wurden im Vergleich zu mehrknotigen Strumae (113) häufiger genetische Veränderungen gefunden.

Bezüglich des Einflusses des Jodmangels gibt es kontroverse Ansichten. Laut einer Analyse von verschiedenen Jodversorgungsgebieten innerhalb eines Landes von Gozu et al. (103) konnte innerhalb der Untersuchungspopulation kein signifikanter Unterschied für die Häufung des Vorkommens von heißen Knoten in Jodmangelgebieten gefunden werden. Bei anderen vorausgegangen

Untersuchungen, der zum Teil gleichen Patienten, konnte eine Häufung von diagnostizierten Knoten direkt nach Jodsubstitution gezeigt werden (11).

Weitere Studien bestätigen die Beeinflussung durch das vorherrschende Jodangebot. So konnte in geografischen Regionen mit Jodmangel circa die Hälfte aller Fälle von Hyperthyreose auf ein autonomes Geschehen in der SD zurückgeführt werden (114). In der Schweiz, ein Gebiet der ehemals moderaten Jodmangelversorgung, erreichte man durch Jodsubstitution einen signifikanten Rückgang an autonomen Schilddrüsenerkrankungen (115). Ein Krankheitsbild, welches bei Gebieten mit guter Jodversorgung (z.B. Japan), nur noch einen geringen Anteil ausmacht (4). Von einem möglichen Einfluss der seit 1997 in Polen eingeführten Jodsubstitution ist demnach auszugehen.

Die in dieser Studie untersuchten Gruppe von Kindern und Heranwachsenden wies als häufigste Mutation mit 8 von 17 TSHR- Mutations-positiven benignen Schilddrüsenknoten die M453T-Veränderung auf. Diese Mutation wurde zuvor schon in vitro funktionell als konstitutiv aktivierende Mutation des TSHR charakterisiert, erwies sich jedoch mit einem Wert von  $5,2 \pm 0,8$  bei der LRA lediglich mäßig erhöht aktiv (98, 116, 117). Die basale cAMP- Produktion ist um das 5- 7fache erhöht, jedoch ist eine Erhöhung des Inositolphosphates über wildtyp-übliche Werte nicht nachweisbar.

Es werden hauptsächlich die Zellproliferation und Hormonsekretion über den Gs- Signalweg des TSHR gesteigert und weniger die Hormonsynthese und Iodinisierung des Gq- Signalweges beeinflusst. Die Mutation ist nahe dem zytoplasmatischen Ende der zweiten Transmembranhelix des TSHR, welches von der Transmembranhelix 3 und 7 umgeben ist. Diese Stelle ist ein kritischer Punkt der cAMP- Aktivierung des G- Protein- gekoppelten Rezeptors (118). Für die M453T- Mutation sind bisher 40 Fälle (laut TSHR- Datenbank <http://www.tsh-receptor-mutation-database.org>) beschrieben wurden. Darunter sind sowohl 2 Fälle von sporadischer und 1 Fall von familiärer Keimbahnmutation, 1 PTC und 36 autonome Adenome. Zusammen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Fällen konnten bisher demnach 49 heiße Knoten mit der TSHR- Mutation M453T von unterschiedlicher Ätiologie erfasst werden (Tabelle 11). Leider lassen sich nach Recherche von bereits publizierten Fällen bezüglich klinischer Charakteristika keine Besonderheiten an Intensität oder Ausprägung feststellen. Es gibt sowohl klinisch sehr schwer verlaufende Fälle bei Neugeborenen (116) als auch deutlich mildere Verläufe in höheren Lebensaltern (105). Auch in anderen Veröffentlichungen konnte diese Veränderung, genau wie bei dieser Untersuchung, als häufige Mutation unter den TSHR- positiven Mutationen detektiert werden (Tabelle 11). Es ist jedoch anzunehmen, dass bei einem ohnehin ständig aktivierten Rezeptor durch eine dauerhafte TSH- Präsenz der Organismus solche Mutationen mit mäßig erhöhter Aktivität zu tolerieren in der Lage ist (119), wodurch eine höhere Frequenz dieser Mutation zustande kommt.

Beim Vergleich von benignen Knoten mit TSHR- Mutation von Kindern und Heranwachsenden (<25 Jahre) mit Erwachsenen fiel in dieser Untersuchung gleichfalls auf, dass die M453T- Mutation in jüngeren Menschen signifikant häufiger ist als in Erwachsenen ( $p=0,0006$ ).

Unklar bleibt jedoch die Ursache hierfür und bisher kann man nur annehmen, dass die Mutation andere, noch unbekannte, Signalwege beeinflusst und deshalb eventuell einen Selektionsvorteil aufweist. Auch der Fall mit einer gleichzeitigen NRAS- und M453T- Mutation weist keinen speziellen Phänotyp auf. Weitere Untersuchungen sollten mit Fällen von Kindern als Untersuchungsgruppe erfolgen, da scheinbar andere Mutationsmuster als bei Erwachsenen auftreten. Auch die signifikanten Ergebnisse der D633Y- Mutation, welche häufiger in Erwachsenen als in Kindern auftritt, würden diese Vermutung stützen. Dabei konnten in verschiedenen Studien dieser Region der sechsten Transmembran- Helix des TSHR als Hotspot mit besonders vielen bekannten Mutationen und als ein Ort der Interaktion des Rezeptors mit den G- Proteinen identifiziert werden (45, 103, 120-122).

**Tabelle 11** 49 publizierte Fälle mit M453T- Mutation

Referenz	Anzahl Fälle	Alter bei Diagnose	Manifestation	Weitere untersuchte Mutationen	Prävalenz M453T/ TSHR pos. Mutationen
De Roux et al 1996 (116)	1	Neugeborenes	sporadische Keimbahnmutation	-	-
Parma et al.1997 (5)	1	59y	AA	Gsa	-
Duprez et al. 1997 (123)	1	58y	AA	-	-
Lavard et al. 1999 (124)	1	7 Monate	sporadische Keimbahnmutation	-	-
Mircescu et al.2000 (100)	1	11y	Karzinom (PTC)	-	-
Trulzsch et al. 2001 (45)	3	unbekannt	AA	Gsa	3 / 41
Georgopoulos et al. 2003 (39)	1	21 –70y	AA	Gsa	1 / 11
Vanvooren et al. 2002 (46)	1	unbekannt	AA	-	1 / 4
Gozu et al. 2006 (103)	6	43 - 54y	AA	TSHR D727E	6 / 51
Paloz-Paz et al. 2008 (121)	10	22–78y	AA	RAS- Gene (H-,K-,N- RAS), Gsa, PKAR1A	10 / 52
Krämer et al. 2009 (125)	1	3y	AA	-	-
Nishihara et al. 2009 (105)	10	22 – 62y	AA	Gsa	10 / 22
Supornsilchai et al. 2009 (126)	3	2x angeboren; 8 Monate	familiäre Keimbahnmutation	-	-
Lado-Abeal et al. 2010 (10)	1	55y	Karzinom (FTC)	RAS- Gene (H-,K-,N- RAS), PAX/PPAR $\gamma$ , BRAF	-
diese Studie 2014	8	12 - 18y	AA	RAS- Gene (H-,K-,N- RAS), Gsa, BRAF, TSHR D727E	8 / 18

Bei dem Vergleich von benignen heißen Knoten aus Kinder- und Erwachsenenpopulationen wurde als Resultat der mehrfachen M453T- Mutation auch ein signifikant häufiger Austausch von Thymin zu Cytosin (T>C) festgestellt. Dies steht im Widerspruch zu den bisherigen Veröffentlichungen bei Erwachsenen, in welchen der zahlreichste Basenaustausch C>T ist und durch oxidativen Stress induziert wird (127, 128), da dieser die Mutagenese besonders in Schilddrüsenzellen maßgeblich triggert (129). Bei Kindern könnten demnach auch andere Ursachen als Auslöser der Mutationen in Betracht kommen, wie zum Beispiel radioaktive Strahlung.

Die Häufung der A632S- Mutation in malignen heißen Knoten kann ebenfalls als Indiz für ein verändertes Mutationsmuster in Karzinomen der SD gedeutet werden. Funktionelle Daten der untersuchten Mutation liegen bisher nur für die basale cAMP-Konzentration vor. Sie zeigen eine 0,5fache Konzentration der normalerweise vorkommenden cAMP- Konzentration, welche die phänotypisch auftretende Hyperthyreose jedoch nicht erklären kann. Phänotypische Auffälligkeiten sind bei der geringen Anzahl von malignen Tumoren (3 Fälle: 2 PTC und 1 FTC von Russo et al. (130)) nicht zu erkennen.

Der TSHR- Polymorphismus D727E konnte bei den Patienten dieser Studie in 10 Fällen von gutartigen Schilddrüsenknoten festgestellt werden. Die Inzidenz betrug somit 34,5% bei den gutartigen Knoten und 30,3% der Veränderungen insgesamt. Dies liegt etwas über der in europäischen Erwachsenen (Kaukasier) beschriebenen Häufigkeit von 16,7% (131), ist aber am ehesten der geringen Fallzahl an Untersuchungspersonen der Studie geschuldet und nicht signifikant ( $p=0,098$ ). Der Polymorphismus ist lokalisiert am Carboxyende des TSHR und wurde bereits als Ursache von nicht immunologischer Hyperthyreose diskutiert (132). Dabei gibt es aber durchaus widersprüchliche Ergebnisse und Studien, die eine mögliche Beteiligung in Frage stellen (131). In funktionellen Studien konnte bisher kein Nachweis einer erhöhten basalen cAMP- Konzentration gegenüber dem TSHR- Wildtyp gezeigt werden (38, 110, 133). Bei in vitro- modifizierten Doppelmутanten mit der TSHR- Veränderung A593N konnte jedoch eine erhöhte konstitutive Rezeptoraktivität ermittelt werden, als bei den TSHR- Varianten allein (133). Man geht daher von einer möglichen Kombination von Rezeptorveränderungen aus, die sich aber nur im Zusammenspiel als mutmaßlich klinisch relevant erweisen (121). Um eine mögliche Beteiligung und Beeinträchtigung der Rezeptorfunktion nachzuweisen, sollten noch weitere Testreihen zur Funktionalität mit Doppelmутanten in den 5 Fällen der Studie von D727E- Polymorphismus und aktivierender TSHR- Mutation erfolgen.

Die in dieser Studie erstmals detektierte Mutation A538T ist in der vierten transmembranen Domäne des TSHR lokalisiert. Bei den funktionellen Untersuchungen fiel auf, dass die basale Akkumulation von cAMP in beiden getesteten Zelllinien (HEK<sub>GT</sub>293 und COS-7) noch unter der beim wildtypischen Rezeptor gemessenen Konzentration lag, und somit keinen Anhaltspunkt für eine dauerhafte Aktivierung des Gs $\alpha$ - getriggerten Signalweges darstellt. Auch bei der Stimulation mit rhTSH waren nur wildtyp- ähnliche Konzentrationen im cAMP- Assay erreicht worden.

Im Gq- getriggerten Signalweg des TSHR ergab sich ebenfalls kein Hinweis auf eine kontinuierliche Aktivierung, da auch hier die basalen Werte nicht erhöht waren und die Stimulation mit TSH Messwerte unter denen des normalen TSHR aufwies. Der Patient (Nummer 15; Tabelle 2 und Tabelle 6) wies klinisch eine auffälligen Hyperthyreose auf. Ansonsten konnte aber mittels klinischer Parameter keine Abgrenzung zu anderen Patienten getroffen werden. Die in vivo erhobenen Daten konnten demzufolge in vitro nicht bestätigt werden. Dieses Phänomen wurde auch schon bei anderen Mutationen beobachtet (59;78). So wurden bereits 5 andere Mutationen (T620I; F666L; N670S; L677V; I691F) bei in vitro Bestimmungen als nicht konstitutiv aktiv beschrieben, obwohl phänotypisch eine Hyperthyreose vorlag. Zur genauen Aktivitätsbestimmung ist die Normierung der gemessenen Konzentrationen von cAMP oder IP auf die jeweilige Rezeptordichte nötig, da es sonst zu Verzerrungen der Ergebnisse kommen kann. In früheren Publikationen zeigte sich die LRA- Messung als bislang beste Messmethode der rezeptordichten- unabhängigen Aktivität (96). Bei der in dieser Studie detektierten Mutation betrug der LRA 0,4 in COS-7- Zellen und 0,6 in HEK- Zellen. Lüblinghoff et al. (117) konnten bei Untersuchungen von LRA- Werten von bekannten Mutationen bereits keine Korrelationen von klinischen Parametern und signifikante Zusammenhänge nachweisen, wie es auch in dieser Untersuchung der Fall zu sein scheint. Damit ist es unwahrscheinlich, dass die Veränderung A538T die Ursache der Hyperthyreose ist, da keine konstitutive Rezeptoraktivität nachgewiesen werden konnte. Es ist zu vermuten, dass hier ein anderer, bisher noch unbekannter, Mechanismus zugrunde liegt (z.B. Veränderungen in anderen G- Protein- Untereinheiten der Adenylatzyklase oder der Phosphodiesterase).

Dies trifft mutmaßlich auch für die 16 Fälle dieser Untersuchung mit einer stillen oder keiner Mutation im TSHR zu. Dass bei 48,5% der Fälle die Ursache der Hyperthyreose bisher nicht feststeht liegt durchaus im Rahmen dessen, was in anderen Studien festgestellt wurde (30-40%; (38, 45, 103)). Es wird vermutet, dass die cAMP- Aktivierung nicht ausschließlich durch die transmembranösen und intrazellulären Bestandteile des TSHR erfolgt (5, 38). Auch könnten Mutationen weiter abwärts in der Signalkaskade oder Mutationen in anderen Signalkaskaden (z.B. Tyrosinkinase- Signale von Insulin-like- Growthfaktor-1 (IGF-1)) die Rezeptorfunktion beeinflussen (134).

Die Testung weiterer Mutationen in bekannten beeinflussenden Signalkaskaden wie dem MAPK- Weg erbrachte eine NRAS- Mutation bei einem Patienten (Patient 4 in Tabelle 2 und Tabelle 6) mit einem follikulären Adenom unklarer Prognose. RAS- Mutationen werden mutmaßlich als „first hit“ in der Karzinomentstehung angesehen (135, 136), was in diesem Fall auch durchaus wahrscheinlich sein könnte, da die histologische Prognose unklar ist. Eine gleichzeitige TSHR- Mutation konnte schon in 2 Fällen (137, 138) nachgewiesen werden, scheint aber von geringer klinischer Bedeutung zu sein, da bei den untersuchten Parametern kein spezieller Phänotyp auffällig ist und diese Mutation bei Kindern eher unüblich ist (64).

In dieser Studie konnte im MAPK- Signalweg eine weitere Mutation von PAX8/PPAR $\gamma$  (Patient 31 in Tabelle 2 und Tabelle 6) gefunden werden. Diese Veränderung von FTC ist mit 63% der Fälle (139) recht häufig und tritt jedoch, wie in diesem Beispiel auch, in follikulären Varianten des PTC mit einer Häufigkeit von 37,5% auf (71, 75-78). Man kann anhand der klinischen Parameter allein jedoch auch hier keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein der Mutation ziehen.

## Datenbankvergleich

Für die vorliegende Studie wurden 2 Mutations- Datenbanken zur Generierung einer möglichst umfassenden und vollständigen Fallsammlung herangezogen. Beide Systeme hatten dabei durchaus ihre Vor- wie Nachteile.

Die COSMIC- Datenbank des Sanger Institutes legt ihr Hauptaugenmerk auf eine möglichst vollständige Sammlung aller in benignen und malignen Tumoren gefundenen genetischen Veränderungen des Menschen. Dabei werden verschiedene untersuchte Gene in unterschiedlichen Geweben erfasst und als Grafik, Tabelle oder als exportierbare Version bereitgestellt. Die Erfassung neuer Daten erfolgt über ein duales System. So werden sowohl aktuelle Publikationen in wissenschaftlichen Medien eingepflegt, als auch die Ergebnisse des Genom- weiten Screenings des Cancer Genom-Project erfasst. Dies erfolgt beides halbautomatisch, hat aber scheinbar einen höheren Ausschluss von Publikationen zur Folge, allein schon wegen der zu bewältigenden Datenmenge. So lässt sich für den TSHR feststellen, dass mehrere Publikationen nicht erfasst werden, welche aber zum Beispiel in der Leipziger Datenbank gelistet sind (Stand: 03/2015: ; Parma et al. 1997 (5); Sancak et al. 2011 (113); De Roux et al. 1996 (116); Arseven et al. 2000 (140)). Die COSMIC- Datenbank erfasst jedoch keine Fälle von familiären oder sporadischen Keimbahnmutationen. Man kann sich die Ergebnisse einer Suche nach allgemeinen Stichpunkten, konkreten Genen oder Phänotypen (z.B. histologische Diagnosen) darstellen lassen. Die Darstellung der Ergebnisse ist hierbei bestimmt von der genetischen Sequenzierung und zum Teil durch die Fülle an Verlinkungen zu anderen Quellenangaben sehr unübersichtlich. Dabei wird jede Version eines Genes als eigenständige Veränderung abgebildet, was aber gerade bei der Anzeige für Prävalenzen bezüglich des gesamten Gens für den Benutzer schwierig darstellbar ist. Dennoch ist gerade dadurch die Recherche nach zusätzlichen Angaben bezüglich der exakten Genveränderung und deren Funktion erleichtert. Es können auch andere getestete Gene, wie im Fall der vorliegenden Studie BRAF und RAS, mit erfasst und gelistet werden, falls sie in der gleichen Referenz untersucht wurden. Die grafische Aufarbeitung basiert im Wesentlichen auf einem Histogramm, das einen ersten Überblick zur genetischen Variabilität der umgebenden Region des Chromosoms ermöglicht und auf einer Darstellung der Aufteilung zu der Art der Veränderungen des Genes (Missens Mutation, Deletion, Insertion) beruht.

Die Datenbank des Universitätsklinikums Leipzig ist dagegen spezialisiert auf die Darstellung einer Sammlung von TSHR- Mutationen. Es werden hier jegliche Veränderungen des Rezeptors sowohl in



klinisch hyper- wie in hypothyreoten Patienten als auch sporadische und familiäre Keimbahnmutationen den TSHR betreffend angezeigt. Anzeigen lassen kann sich der Benutzer nach selbstgewählten Such- und Sortierkriterien alle bisher untersuchten Rezeptorveränderungen. Die bisher erfassten 160 Mutationen werden mit funktionellen Symbolen zur besseren Übersichtlichkeit in einem Cartoon dargestellt, um deren genaue Lokalisation innerhalb der Konformation des Proteins aufzuzeigen. Prävalenzen sind hier für das komplette Gen, geordnet nach Lokalisation innerhalb des Gens, gemeinsam in einem neuen Reiter abgebildet. Dennoch ist eine Angabe der Gesamtmutationsfrequenz auch hier nicht zu ermitteln, da Mutationsnegative der jeweiligen Publikationen nicht immer benannt wurden. Als Besonderheit sind hier auch Keimbahnmutationen (familiäre und sporadische) mit gelistet und zur besseren Verständlichkeit mit allen Angaben zu Stammbäumen und Erbgang grafisch dargestellt. Die funktionellen Daten der jeweiligen Mutation mit ihren Referenzen sind bei dieser Datenbank gleichfalls erfasst worden und ermöglichen eine umfassende Information über den in vivo- und in vitro- Phänotyp der Veränderung. Leider werden in dieser Datenbank keine anderen parallel untersuchten Gene erfasst. Wünschenswert wäre zum Beispiel, dass der noch fragwürdig relevante TSHR- Polymorphismus D727E, andere, für die Tumorgenese mit verantwortlichen Gene, wie BRAF, PAX/PPAR $\gamma$ ; oder auch stumme Mutationen erfasst werden, wenn sie in den jeweiligen Publikationen mit untersucht wurden.

Beide Datenbanken haben daher für bestimmte Recherchen ihre spezifischen Vorteile. Sucht man nach laborchemischen, molekulargenetischen Gesichtspunkten einer TSHR- Mutation oder nach anderen Genen sollte man die COSMIC- Datenbank nutzen. Legt man jedoch Wert auf eine möglichst vollständige Zusammenfassung aller bisher veröffentlichten Fälle an TSHR- Veränderungen mit funktionellen Daten, so sollte man auch in Hinblick auf die klinische Darstellung, die TSHR- Datenbank des Universitätsklinikums Leipzig bevorzugen.

## 6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Doktorgrades Dr.med.

*„Heiße“ Schilddrüsenknoten bei Kindern:*

*Mutationshäufigkeiten und Mutationsmuster aktivierender TSH-Rezeptor- und Gs alpha- Mutationen*

eingereicht von: Eva Typlt

angefertigt in:

Universität Leipzig / Universitätsklinikum Leipzig  
Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie

betreut von: Prof. Dr. med. Ralf Paschke

Juni 2015

In dieser Arbeit erfolgte die erste Mutationsanalyse von szintigrafisch heißen Schilddrüsenknoten (HTNs) einer größeren Population von Kindern und Heranwachsenden (unter 25 Jahren).

Dazu wurden 33 konsekutive Proben von Kindern und Heranwachsenden (29 benigne und 4 maligne HTNs) auf Mutationen im Thyreotropinrezeptor (TSHR) oder im Gs $\alpha$ - Protein untersucht. Auch bereits bekannte Gene der Tumorgenese, wie die RAS- Gene (H-, N-, K-RAS), BRAF und chromosomale Umlagerungen (PAX8/PPAR $\gamma$ , RET/PTC1 und RET/PTC3), wurden mit erfasst.

In 17 der 29 benignen HTNs (59%) konnte eine TSHR- Mutation nachgewiesen werden. Dabei war die M453T- Mutation mit 47% aller TSHR- Mutations- positiven Proben die Häufigste.

Unter den anderen 7 TSHR- Mutationen konnten die T632I und D633Y jeweils in 2 Fällen nachgewiesen werden. Alle anderen detektierten Veränderungen traten nur einmal auf. Darunter ist auch eine erstmal nachgewiesene TSHR- Mutation A538T. Weiterhin wurde eine NRAS- Mutation innerhalb eines benignen HTNs mit einer M453T- Mutation detektiert. In einem malignen HTN konnte ebenfalls ein PAX8/PPAR $\gamma$ - Rearrangement aufgezeigt werden. In einem papillären Karzinom wurde zusätzlich im TSHR- Gen eine T632I- Veränderung identifiziert.

Durch einen Vergleich mit anderen bereits publizierten Fällen fiel auf, dass die M453T- Mutation in Kindern signifikant häufiger ist. Auch eine signifikante Häufung von D633Y- Mutationen war erkennbar, fiel jedoch deutlich schwächer aus. Die jeweiligen zugrundeliegenden Basenaustausche waren in gleicher Weise signifikant verändert.

### Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass bei Kindern mutmaßlich ein anderes Mutationsmuster als bei Erwachsenen auftritt, was die Vermutung nahe legt, dass hier unterschiedliche Einflussgrößen bei der Genese der heißen Schilddrüsenknoten eine Rolle spielen könnten.

Eine neue Mutation des TSHR und erstmals auch eine Angabe zur Häufigkeit für TSHR- Mutationen in Kindern wurde hiermit beschrieben.

## 7 Referenzen

1. de Luca F., J.L.Chaussain, and J.C.Job. "Hyperfunctioning thyroid nodules in children and adolescents." *Acta Paediatr.Scand.* 75, no. 1(January 1986):118-23.
2. W.Hung, K.D.Anderson, R.S.Chandra, S.P.Kapur, K.Patterson, J.G.Randolph, and G.P.August. "Solitary thyroid nodules in 71 children and adolescents." *J.Pediatr.Surg.* 27, no. 11(November 1992):1407-09.
3. M.Niedziela, D.Breborowicz, E.Trejster, and E.Korman. "Hot nodules in children and adolescents in western Poland from 1996 to 2000: clinical analysis of 31 patients." *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* 15, no. 6(June 2002):823-30.
4. E.Nishihara, N.Amino, K.Maekawa, H.Yoshida, M.Ito, S.Kubota, S.Fukata, and A.Miyauchi. "Prevalence of TSH receptor and Gsalpha mutations in 45 autonomously functioning thyroid nodules in Japan." *Endocr.J.* 56, no. 6(2009):791-98.
5. J.Parma, L.Duprez, Van Sande J., J.Hermans, P.Rocmans, Van Vliet G., S.Costagliola, P.Rodien, J.E.Dumont, and G.Vassart. "Diversity and prevalence of somatic mutations in the thyrotropin receptor and Gs alpha genes as a cause of toxic thyroid adenomas." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82, no. 8(August 1997):2695-701.
6. P.Agretti, M.Segni, M.G.De, E.Ferrarini, C.C.Di, A.Corrias, G.Weber, D.Larizza, V.Calcatera, M.R.Pelizzo, G.Cesaretti, P.Vitti, and M.Tonacchera. "Prevalence of activating thyrotropin receptor and Gsalpha gene mutations in paediatric thyroid toxic adenomas: a multicentric Italian study." *Clin.Endocrinol.(Oxf)*(January 2013).
7. H.Gharib, E.Papini, R.Paschke, D.S.Duick, R.Valcavi, L.Hegedus, and P.Vitti. "American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association Medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules: executive summary of recommendations." *Endocr.Pract.* 16, no. 3(May 2010):468-75.
8. M.Niedziela. "Pathogenesis, diagnosis and management of thyroid nodules in children." *Endocr.Relat Cancer* 13, no. 2(June 2006):427-53.
9. C.S.Kim and X.Zhu. "Lessons from mouse models of thyroid cancer." *Thyroid* 19, no. 12(December 2009):1317-31.
10. J.Lado-Abeal, R.Celestino, S.B.Bravo, M.E.Garcia-Rendueles, J.de la Calzada, I.Castro, P.Castro, C.Espadinha, F.Palos, P.Soaes, C.V.Alvarez, M.Sobrinho-Simoes, and J.Cameselle-Teijeiro. "Identification of a paired box gene 8-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PAX8-PPARgamma) rearrangement mosaicism in a patient with an autonomous functioning follicular thyroid carcinoma bearing an activating mutation in the TSH receptor." *Endocr.Relat Cancer* 17, no. 3(September 2010):599-610.
11. M.Niedziela, D.Breborowicz, E.Trejster, and E.Korman. "Hot nodules in children and adolescents in western Poland from 1996 to 2000: clinical analysis of 31 patients." *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* 15, no. 6(June 2002):823-30.
12. R.D.Croom, III, C.G.Thomas, Jr., R.L.Reddick, and M.T.Tawil. "Autonomously functioning thyroid nodules in childhood and adolescence." *Surgery* 102, no. 6(December 1987):1101-08.
13. H.R.Maxon, S.R.Thomas, E.L.Saenger, C.R.Buncher, and J.G.Kereiakes. "Ionizing irradiation and the induction of clinically significant disease in the human thyroid gland." *Am.J.Med.* 63, no. 6(December 1977):967-78.
14. G.A.Hanson, R.A.Komorowski, J.M.Cerletty, and S.D.Wilson. "Thyroid gland morphology in young adults: normal subjects versus those with prior low-dose neck irradiation in childhood." *Surgery* 94, no. 6(December 1983):984-88.
15. M.T.Rojeski and H.Gharib. "Nodular thyroid disease. Evaluation and management." *N.Engl.J.Med.* 313, no. 7(August 1985):428-36.
16. J.B.Vander, E.A.Gaston, and T.R.Dawber. "The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy." *Ann.Intern.Med.* 69, no. 3(September 1968):537-40.
17. E.C.Ridgway. "Clinical review 30: Clinician's evaluation of a solitary thyroid nodule." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 74, no. 2(February 1992):231-35.

18. L.Hegedus. "Clinical practice. The thyroid nodule." *N.Engl.J.Med.* 351, no. 17(October 2004):1764-71.
19. R.T.Kirkland, J.L.Kirkland, H.S.Rosenberg, F.J.Harberg, L.Librik, and G.W.Clayton. "Solitary thyroid nodules in 30 children and report of a child with a thyroid abscess." *Pediatrics* 51, no. 1(January 1973):85-90.
20. M.L.Rallison, B.M.Dobyns, F.R.Keating, Jr., J.E.Rall, and F.H.Tyler. "Thyroid nodularity in children." *JAMA* 233, no. 10(September 1975):1069-72.
21. M.D.Scott and J.D.Crawford. "Solitary thyroid nodules in childhood: is the incidence of thyroid carcinoma declining?" *Pediatrics* 58, no. 4(October 1976):521-25.
22. L.Lavard, I.Ranlov, H.Perrild, O.Andersen, and B.B.Jacobsen. "Incidence of juvenile thyrotoxicosis in Denmark, 1982-1988. A nationwide study." *Eur.J.Endocrinol.* 130, no. 6(June 1994):565-68.
23. P.Kopp. "The TSH receptor and its role in thyroid disease." *Cell Mol.Life Sci.* 58, no. 9(August 2001):1301-22.
24. G.Radetti, A.Zavallone, L.Gentili, P.Beck-Peccoz, and G.Bona. "Foetal and neonatal thyroid disorders." *Minerva Pediatr.* 54, no. 5(October 2002):383-400.
25. R.M.Tuttle, D.W.Ball, D.Byrd, R.A.Dilawari, G.M.Doherty, Q.Y.Duh, H.Ehya, W.B.Farrar, R.I.Haddad, F.Kandeel, R.T.Kloos, P.Kopp, D.M.Lamonica, T.R.Loree, W.M.Lydiatt, J.C.McCaffrey, J.A.Olson, Jr., L.Parks, J.A.Ridge, J.P.Shah, S.I.Sherman, C.Sturgeon, S.G.Waguespack, T.N.Wang, and L.J.Wirth. "Thyroid carcinoma." *J.Natl.Compr.Canc.Netw.* 8, no. 11(November 2010):1228-74.
26. D.S.Cooper, G.M.Doherty, B.R.Haugen, R.T.Kloos, S.L.Lee, S.J.Mandel, E.L.Mazzaferri, B.McIver, F.Pacini, M.Schlumberger, S.I.Sherman, D.L.Steward, and R.M.Tuttle. "Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer." *Thyroid* 19, no. 11(November 2009):1167-214.
27. P.Perros, K.Boelaert, S.Colley, C.Evans, R.M.Evans, B.G.Gerrard, J.Gilbert, B.Harrison, S.J.Johnson, T.E.Giles, L.Moss, V.Lewington, K.Newbold, J.Taylor, R.V.Thakker, J.Watkinson, and G.R.Williams. "Guidelines for the management of thyroid cancer." *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 81 Suppl 1,(July 2014):1-122.
28. J.I.Hamburger. "Evolution of toxicity in solitary nontoxic autonomously functioning thyroid nodules." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 50, no. 6(June 1980):1089-93.
29. C.G.Thomas, Jr. and R.D.Croom, III. "Current management of the patient with autonomously functioning nodular goiter." *Surg.Clin.North Am.* 67, no. 2(April 1987):315-28.
30. M.U.Kuefer, M.Moinuddin, R.L.Heideman, R.H.Lustig, S.R.Rose, S.Burstein, L.VanMiddlesworth, I.Fleming, J.J.Jenkins, and P.D.Shearer. "Papillary thyroid carcinoma: demographics, treatment, and outcome in eleven pediatric patients treated at a single institution." *Med.Pediatr.Oncol.* 28, no. 6(June 1997):433-40.
31. H.Volzke, J.Ludemann, D.M.Robinson, K.W.Spieker, C.Schwahn, A.Kramer, U.John, and W.Meng. "The prevalence of undiagnosed thyroid disorders in a previously iodine-deficient area." *Thyroid* 13, no. 8(August 2003):803-10.
32. R.Paschke. "Constitutively activating TSH receptor mutations as the cause of toxic thyroid adenoma, multinodular toxic goiter and autosomal dominant non autoimmune hyperthyroidism." *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 104 Suppl 4,(1996):129-32.
33. A.Takeshita, Y.Nagayama, N.Yokoyama, N.Ishikawa, K.Ito, T.Yamashita, T.Obata, Y.Murakami, K.Kuma, J.Takamatsu, and . "Rarity of oncogenic mutations in the thyrotropin receptor of autonomously functioning thyroid nodules in Japan." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 80, no. 9(September 1995):2607-11.
34. C.Hedinger, E.D.Williams, and L.H.Sobin. "The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition." *Cancer* 63, no. 5(March 1989):908-11.
35. E.Laurent, J.Mockel, S.J.Van, I.Graff, and J.E.Dumont. "Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid." *Mol.Cell Endocrinol.* 52, no. 3(August 1987):273-78.
36. J.E.Dumont, F.Lamy, P.Roger, and C.Maenhaut. "Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors." *Physiol Rev.* 72, no. 3(July 1992):667-97.

37. G.Kleinau, M.Claus, H.Jaeschke, S.Mueller, S.Neumann, R.Paschke, and G.Krause. "Contacts between extracellular loop two and transmembrane helix six determine basal activity of the thyroid-stimulating hormone receptor." *J.Biol.Chem.* 282, no. 1(January 2007):518-25.
38. D.Fuhrer, H.P.Holzapfel, P.Wonerow, W.A.Scherbaum, and R.Paschke. "Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene and not in the Gs alpha protein gene in 31 toxic thyroid nodules." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82, no. 11(November 1997):3885-91.
39. N.A.Georgopoulos, G.P.Sykitotis, A.Sgourou, A.Papachatzopoulou, K.B.Markou, V.Kyriazopoulou, A.G.Papavassiliou, and A.G.Vagenakis. "Autonomously functioning thyroid nodules in a former iodine-deficient area commonly harbor gain-of-function mutations in the thyrotropin signaling pathway." *Eur.J.Endocrinol.* 149, no. 4(October 2003):287-92.
40. H.I.Gozu, R.Bircan, K.Krohn, S.Muller, S.Vural, C.Gezen, H.Sargin, D.Yavuzer, M.Sargin, B.Cirakoglu, and R.Paschke. "Similar prevalence of somatic TSH receptor and Gsalpha mutations in toxic thyroid nodules in geographical regions with different iodine supply in Turkey." *Eur.J.Endocrinol.* 155, no. 4(October 2006):535-45.
41. H.P.Holzapfel, D.Fuhrer, P.Wonerow, G.Weinland, W.A.Scherbaum, and R.Paschke. "Identification of constitutively activating somatic thyrotropin receptor mutations in a subset of toxic multinodular goiters." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82, no. 12(December 1997):4229-33.
42. J.Lyons, C.A.Landis, G.Harsh, L.Vallar, K.Grunewald, H.Feichtinger, Q.Y.Duh, O.H.Clark, E.Kawasaki, H.R.Bourne, and . "Two G protein oncogenes in human endocrine tumors." *Science* 249, no. 4969(August 1990):655-59.
43. C.O'Sullivan, C.M.Barton, S.L.Staddon, C.L.Brown, and N.R.Lemoine. "Activating point mutations of the gsp oncogene in human thyroid adenomas." *Mol.Carcinog.* 4, no. 5(1991):345-49.
44. M.Tonacchera, P.Agretti, L.Chiovato, V.Rosellini, G.Ceccarini, A.Perri, P.Viacava, A.G.Naccarato, P.Miccoli, A.Pinchera, and P.Vitti. "Activating thyrotropin receptor mutations are present in nonadenomatous hyperfunctioning nodules of toxic or autonomous multinodular goiter." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85, no. 6(June 2000):2270-74.
45. B.Trulzsch, K.Krohn, P.Wonerow, S.Chey, H.P.Holzapfel, F.Ackermann, D.Fuhrer, and R.Paschke. "Detection of thyroid-stimulating hormone receptor and Gsalpha mutations: in 75 toxic thyroid nodules by denaturing gradient gel electrophoresis." *J.Mol.Med.(Berl)* 78, no. 12(2001):684-91.
46. V.Vanvooren, S.Uchino, L.Duprez, M.J.Costa, J.Vandekerckhove, J.Parma, G.Vassart, J.E.Dumont, Van Sande J., and S.Noguchi. "Oncogenic mutations in the thyrotropin receptor of autonomously functioning thyroid nodules in the Japanese population." *Eur.J.Endocrinol.* 147, no. 3(September 2002):287-91.
47. K.O.Schwab, N.Pfarr, N.Werf-Grohmann, M.Pohl, J.Radecke, T.Musholt, and J.Pohlenz. "Autonomous thyroid adenoma: only an adulthood disease?" *J.Pediatr.* 154, no. 6(June 2009):931-33.
48. K.Fransen, M.Klintonas, A.Osterstrom, J.Dimberg, H.J.Monstein, and P.Soderkvist. "Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas." *Carcinogenesis* 25, no. 4(April 2004):527-33.
49. M.S.Brose, P.Volpe, M.Feldman, M.Kumar, I.Rishi, R.Gerrero, E.Einhorn, M.Herlyn, J.Minna, A.Nicholson, J.A.Roth, S.M.Albelda, H.Davies, C.Cox, G.Brignell, P.Stephens, P.A.Futreal, R.Wooster, M.R.Stratton, and B.L.Weber. "BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma." *Cancer Res.* 62, no. 23(December 2002):6997-7000.
50. C.J.Der, T.G.Krontiris, and G.M.Cooper. "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79, no. 11(June 1982):3637-40.
51. Y.E.Nikiforov and M.N.Nikiforova. "Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer." *Nat.Rev.Endocrinol.* 7, no. 10(October 2011):569-80.
52. A.E.Karnoub and R.A.Weinberg. "Ras oncogenes: split personalities." *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9, no. 7(July 2008):517-31.
53. A.Moon. "Differential functions of Ras for malignant phenotypic conversion." *Arch.Pharm.Res.* 29, no. 2(February 2006):113-22.

54. J.M.Kyriakis. "Thinking outside the box about Ras." *J.Biol.Chem.* 284, no. 17(April 2009):10993-94.
55. H.I.Saavedra, J.A.Knauf, J.M.Shirokawa, J.Wang, B.Ouyang, R.Elisei, P.J.Stambook, and J.A.Fagin. "The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway." *Oncogene* 19, no. 34(August 2000):3948-54.
56. H.G.Suarez, J.A.Du Villard, B.Caillou, M.Schlumberger, M.Tubiana, C.Parmentier, and R.Monier. "Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas." *Oncogene* 2, no. 4(April 1988):403-06.
57. J.L.Bos. "ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Res.* 49, no. 17(September 1989):4682-89.
58. E.F.Pai, W.Kabsch, U.Krengel, K.C.Holmes, J.John, and A.Wittinghofer. "Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation." *Nature* 341, no. 6239(September 1989):209-14.
59. D.Russo, F.Arturi, R.Wicker, G.D.Chazenbalk, M.Schlumberger, J.A.DuVillard, B.Caillou, R.Monier, B.Rapoport, S.Filetti, and . "Genetic alterations in thyroid hyperfunctioning adenomas." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 80, no. 4(April 1995):1347-51.
60. T.Kondo, S.Ezzat, and S.L.Asa. "Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia." *Nat.Rev.Cancer* 6, no. 4(April 2006):292-306.
61. M.N.Nikiforova, R.A.Lynch, P.W.Biddinger, E.K.Alexander, G.W.Dorn, G.Tallini, T.G.Kroll, and Y.E.Nikiforov. "RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88, no. 5(May 2003):2318-26.
62. G.M.Howell, S.P.Hodak, and L.Yip. "RAS mutations in thyroid cancer." *Oncologist.* 18, no. 8(2013):926-32.
63. C.T.Esapa, S.J.Johnson, P.Kendall-Taylor, T.W.Lennard, and P.E.Harris. "Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia." *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 50, no. 4(April 1999):529-35.
64. C.Fenton, J.Anderson, Y.Lukes, C.A.Dinauer, R.M.Tuttle, and G.L.Francis. "Ras mutations are uncommon in sporadic thyroid cancer in children and young adults." *J.Endocrinol.Invest* 22, no. 10(November 1999):781-89.
65. H.Davies, G.R.Bignell, C.Cox, P.Stephens, S.Edkins, S.Clegg, J.Teague, H.Woffendin, M.J.Garnett, W.Bottomley, N.Davis, E.Dicks, R.Ewing, Y.Floyd, K.Gray, S.Hall, R.Hawes, J.Hughes, V.Kosmidou, A.Menzies, C.Mould, A.Parker, C.Stevens, S.Watt, S.Hooper, R.Wilson, H.Jayatilake, B.A.Gusterson, C.Cooper, J.Shipley, D.Hargrave, K.Pritchard-Jones, N.Maitland, G.Chenevix-Trench, G.J.Riggins, D.D.Bigner, G.Palmieri, A.Cossu, A.Flanagan, A.Nicholson, J.W.Ho, S.Y.Leung, S.T.Yuen, B.L.Weber, H.F.Seigler, T.L.Darrow, H.Paterson, R.Marais, C.J.Marshall, R.Wooster, M.R.Stratton, and P.A.Futreal. "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* 417, no. 6892(June 2002):949-54.
66. M.Xing. "BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications." *Endocr.Rev.* 28, no. 7(December 2007):742-62.
67. E.T.Kimura, M.N.Nikiforova, Z.Zhu, J.A.Knauf, Y.E.Nikiforov, and J.A.Fagin. "High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma." *Cancer Res.* 63, no. 7(April 2003):1454-57.
68. Y.Cohen, M.Xing, E.Mambo, Z.Guo, G.Wu, B.Trink, U.Beller, W.H.Westra, P.W.Ladenson, and D.Sidransky. "BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma." *J.Natl.Cancer Inst.* 95, no. 8(April 2003):625-27.
69. M.Xing. "BRAF mutation in thyroid cancer." *Endocr.Relat Cancer* 12, no. 2(June 2005):245-62.
70. L.E.Henke, S.M.Perkins, J.D.Pfeifer, C.Ma, Y.Chen, T.DeWees, and P.W.Grigsby. "BRAF V600E mutational status in pediatric thyroid cancer." *Pediatr.Blood Cancer* 61, no. 7(July 2014):1168-72.
71. T.G.Kroll, P.Sarraf, L.Pecciarini, C.J.Chen, E.Mueller, B.M.Spiegelman, and J.A.Fletcher. "PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]." *Science* 289, no. 5483(August 2000):1357-60.
72. P.J.Gregory, X.Wang, B.L.Allard, M.Sahin, X.L.Wang, I.D.Hay, H.J.Hiddinga, S.S.Deshpande, T.G.Kroll, S.K.Grebe, N.L.Eberhardt, and B.McIver. "The PAX8/PPARgamma fusion oncoprotein transforms

immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPARgamma inhibition." *Oncogene* 23, no. 20(April 2004):3634-41.

73. K.A.Placzkowski, H.V.Reddi, S.K.Grebe, N.L.Eberhardt, and B.McIver. "The Role of the PAX8/PPARgamma Fusion Oncogene in Thyroid Cancer." *PPAR.Res.* 2008,(2008):672829.
74. T.J.Giordano, A.Y.Au, R.Kuick, D.G.Thomas, D.R.Rhodes, K.G.Wilhelm, Jr., M.Vinco, D.E.Misek, D.Sanders, Z.Zhu, R.Ciampi, S.Hanash, A.Chinnaiyan, R.J.Clifton-Bligh, B.G.Robinson, Y.E.Nikiforov, and R.J.Koenig. "Delineation, functional validation, and bioinformatic evaluation of gene expression in thyroid follicular carcinomas with the PAX8-PPARG translocation." *Clin.Cancer Res.* 12, no. 7 Pt 1(April 2006):1983-93.
75. P.Castro, A.P.Rebocho, R.J.Souares, J.Magalhaes, L.Roque, V.Trovisco, d.C.Vieira, I, M.Cardoso-de-Oliveira, E.Fonseca, P.Souares, and M.Sobrinho-Simoes. "PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 91, no. 1(January 2006):213-20.
76. C.A.French, E.K.Alexander, E.S.Cibas, V.Nose, J.Laguette, W.Faquin, J.Garber, F.Moore, Jr., J.A.Fletcher, P.R.Larsen, and T.G.Kroll. "Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer." *Am.J.Pathol.* 162, no. 4(April 2003):1053-60.
77. M.N.Nikiforova, P.W.Biddinger, C.M.Caudill, T.G.Kroll, and Y.E.Nikiforov. "PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses." *Am.J.Surg.Pathol.* 26, no. 8(August 2002):1016-23.
78. A.R.Marques, C.Espadinha, A.L.Catarino, S.Moniz, T.Pereira, L.G.Sobrinho, and V.Leite. "Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87, no. 8(August 2002):3947-52.
79. A.Fusco, M.Grieco, M.Santoro, M.T.Berlingieri, S.Pilotti, M.A.Pierotti, P.G.Della, and G.Vecchio. "A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases." *Nature* 328, no. 6126(July 1987):170-72.
80. V.Marotta, A.Guerra, M.R.Sapio, and M.Vitale. "RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint." *Eur.J.Endocrinol.* 165, no. 4(October 2011):499-507.
81. M.Grieco, M.Santoro, M.T.Berlingieri, R.M.Melillo, R.Donghi, I.Bongarzone, M.A.Pierotti, P.G.Della, A.Fusco, and G.Vecchio. "PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas." *Cell* 60, no. 4(February 1990):557-63.
82. M.Santoro, N.A.Dathan, M.T.Berlingieri, I.Bongarzone, C.Paulin, M.Grieco, M.A.Pierotti, G.Vecchio, and A.Fusco. "Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RETproto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma." *Oncogene* 9, no. 2(February 1994):509-16.
83. M.Santoro, G.A.Thomas, G.Vecchio, G.H.Williams, A.Fusco, G.Chiappetta, V.Pozcharskaya, T.I.Bogdanova, E.P.Demidchik, E.D.Cherstvov, L.Voscoboinik, N.D.Tronko, A.Carss, H.Bunnell, M.Tonnachera, J.Parma, J.E.Dumont, G.Keller, H.Hofler, and E.D.Williams. "Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers." *Br.J.Cancer* 82, no. 2(January 2000):315-22.
84. F.Minoletti, M.G.Butti, S.Coronelli, M.Miozzo, G.Sozzi, S.Pilotti, A.Tunnacliffe, M.A.Pierotti, and I.Bongarzone. "The two genes generating RET/PTC3 are localized in chromosomal band 10q11.2." *Genes Chromosomes.Cancer* 11, no. 1(September 1994):51-57.
85. G.Tallini and S.L.Asa. "RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma." *Adv.Anat.Pathol.* 8, no. 6(November 2001):345-54.
86. K.N.Patel. "Genetic mutations, molecular markers and future directions in research." *Oral Oncol.* 49, no. 7(July 2013):711-21.
87. H.G.Suarez. "Genetic alterations in human epithelial thyroid tumours." *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 48, no. 5(May 1998):531-46.
88. G.Sassolas, Z.Hafdi-Nejjari, A.Ferraro, M.Decaussin-Petrucchi, B.Rousset, F.Borson-Chazot, E.Borbone, N.Berger, and A.Fusco. "Oncogenic alterations in papillary thyroid cancers of young patients." *Thyroid* 22, no. 1(January 2012):17-26.



89. A.Wirtschafter, R.Schmidt, D.Rosen, N.Kundu, M.Santoro, A.Fusco, H.Mulhaupt, J.P.Atkins, M.R.Rosen, W.M.Keane, and J.L.Rothstein. "Expression of the RET/PTC fusion gene as a marker for papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis." *Laryngoscope* 107, no. 1(January 1997):95-100.
90. O.M.Sheils, J.J.O'earry, V.Uhlmann, K.Lattich, and E.C.Sweeney. "ret/PTC-1 Activation in Hashimoto Thyroiditis." *Int.J.Surg.Pathol.* 8, no. 3(July 2000):185-89.
91. Y.Ishizaka, S.Kobayashi, T.Ushijima, S.Hirohashi, T.Sugimura, and M.Nagao. "Detection of retTPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method." *Oncogene* 6, no. 9(September 1991):1667-72.
92. R.Elisei, C.Romei, T.Vorontsova, B.Cosci, V.Veremeychik, E.Kuchinskaya, F.Basolo, E.P.Demidchik, P.Miccoli, A.Pinchera, and F.Pacini. "RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86, no. 7(July 2001):3211-16.
93. A.Bounacer, R.Wicker, B.Caillou, A.F.Cailleux, A.Sarasin, M.Schlumberger, and H.G.Suarez. "High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation." *Oncogene* 15, no. 11(September 1997):1263-73.
94. C.Ferraz, C.Rehfeld, A.Krogdahl, E.M.Precht Jensen, E.Bosenberg, F.Narz, L.Hegedus, R.Paschke, and M.Eszlinger. "Detection of PAX8/PPARG and RET/PTC rearrangements is feasible in routine air-dried fine needle aspiration smears." *Thyroid* 22, no. 10(October 2012):1025-30.
95. C.Rehfeld, S.Munz, A.Krogdahl, E.M.Jensen, U.Siebolts, C.Ferraz, E.Bosenberg, L.Hegedus, R.Paschke, and M.Eszlinger. "Impact of Different Methodologies on the Detection of Point Mutations in Routine Air-dried Fine Needle Aspiration (FNA) Smears." *Horm.Metab Res.*(March 2013).
96. S.Mueller, H.I.Gozu, R.Bircan, H.Jaesche, M.Eszlinger, J.Lueblinghoff, K.Krohn, and R.Paschke. "Cases of borderline in vitro constitutive thyrotropin receptor activity: how to decide whether a thyrotropin receptor mutation is constitutively active or not?" *Thyroid* 19, no. 7(July 2009):765-73.
97. H.Jaschke, S.Neumann, S.Moore, C.J.Thomas, A.O.Colson, S.Costanzi, G.Kleinau, J.K.Jiang, R.Paschke, B.M.Raaka, G.Krause, and M.C.Gershengorn. "A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR)." *J.Biol.Chem.* 281, no. 15(April 2006):9841-44.
98. H.Jaesche, G.Kleinau, J.Sontheimer, S.Mueller, G.Krause, and R.Paschke. "Preferences of transmembrane helices for cooperative amplification of G(alpha)s and G(alpha)q signaling of the thyrotropin receptor." *Cell Mol.Life Sci.* 65, no. 24(December 2008):4028-38.
99. M.J.Berridge. "Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol." *Biochem.J.* 212, no. 3(June 1983):849-58.
100. H.Mircescu, J.Parma, C.Huot, C.Deal, L.L.Oligny, G.Vassart, and Van Vliet G. "Hyperfunctioning malignant thyroid nodule in an 11-year-old girl: pathologic and molecular studies." *J.Pediatr.* 137, no. 4(October 2000):585-87.
101. P.Kopp, S.Muirhead, N.Jourdain, W.X.Gu, J.L.Jameson, and C.Rodd. "Congenital hyperthyroidism caused by a solitary toxic adenoma harboring a novel somatic mutation (serine281-->isoleucine) in the extracellular domain of the thyrotropin receptor." *J.Clin.Invest* 100, no. 6(September 1997):1634-39.
102. H.Gozu, M.Avсар, R.Bircan, S.Sahin, O.Deyneli, B.Cirakoglu, and S.Akalin. "Mutations in the thyrotropin receptor signal transduction pathway in the hyperfunctioning thyroid nodules from multinodular goiters: a study in the Turkish population." *Endocr.J.* 52, no. 5(October 2005):577-85.
103. H.I.Gozu, R.Bircan, K.Krohn, S.Muller, S.Vural, C.Gezen, H.Sargin, D.Yavuzer, M.Sargin, B.Cirakoglu, and R.Paschke. "Similar prevalence of somatic TSH receptor and Gsalpha mutations in toxic thyroid nodules in geographical regions with different iodine supply in Turkey." *Eur.J.Endocrinol.* 155, no. 4(October 2006):535-45.
104. S.Kraemer, K.Rothe, R.Pfaeffle, D.Fuehrer-Sakel, H.Till, and O.J.Muensterer. "Activating TSH-receptor mutation (Met453Thr) as a cause of adenomatous non-autoimmune hyperthyroidism in a 3-year-old boy." *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* 22, no. 3(March 2009):269-74.

105. E.Nishihara, N.Amino, K.Maekawa, H.Yoshida, M.Ito, S.Kubota, S.Fukata, and A.Miyauchi. "Prevalence of TSH receptor and Gsalpha mutations in 45 autonomously functioning thyroid nodules in Japan." *Endocr.J.* 56, no. 6(2009):791-98.
106. B.Kohn, H.Grasberger, L.L.Lam, A.M.Ferrara, and S.Refetoff. "A somatic gain-of-function mutation in the thyrotropin receptor gene producing a toxic adenoma in an infant." *Thyroid* 19, no. 2(February 2009):187-91.
107. S.Sancak, H.Jaeschke, F.Eren, O.Tarcin, B.Guellueoglu, L.S.Sen, Z.Sever, H.I.Gozu, R.Bircan, S.Akalin, R.Paschke, and M.Eszlinger. "High prevalence of TSHR/Gsalpha mutation-negative clonal hot thyroid nodules (HNs) in a Turkish cohort." *Horm.Metab Res.* 43, no. 8(July 2011):562-68.
108. K.Nanba, T.Usui, S.Minamiguchi, Y.Mori, Y.Watanabe, K.Honda, R.Asato, K.Nakao, S.T.Kawashima, A.Yuno, T.Tamanaha, T.Tagami, M.Naruse, Y.Akiyama, and A.Shimatsu. "Two rare TSH receptor amino acid substitutions in toxic thyroid adenomas." *Endocr.J.* 59, no. 1(2012):13-19.
109. F.Grob, J.Deladoey, L.Legault, L.Spigelblatt, A.Fournier, G.Vassart, and V.G.Van. "Autonomous adenomas caused by somatic mutations of the thyroid-stimulating hormone receptor in children." *Horm.Res.Paediatr.* 81, no. 2(2014):73-79.
110. C.R.Nogueira, P.Kopp, O.K.Arseven, C.L.Santos, J.L.Jameson, and G.Medeiros-Neto. "Thyrotropin receptor mutations in hyperfunctioning thyroid adenomas from Brazil." *Thyroid* 9, no. 11(November 1999):1063-68.
111. P.Kopp, S.J.Van, J.Parma, L.Duprez, H.Gerber, E.Joss, J.L.Jameson, J.E.Dumont, and G.Vassart. "Brief report: congenital hyperthyroidism caused by a mutation in the thyrotropin-receptor gene." *N.Engl.J.Med.* 332, no. 3(January 1995):150-54.
112. C.E.Greer, J.K.Lund, and M.M.Manos. "PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies." *PCR Methods Appl.* 1, no. 1(August 1991):46-50.
113. S.Sancak, H.Jaeschke, F.Eren, O.Tarcin, B.Guellueoglu, L.S.Sen, Z.Sever, H.I.Gozu, R.Bircan, S.Akalin, R.Paschke, and M.Eszlinger. "High prevalence of TSHR/Gsalpha mutation-negative clonal hot thyroid nodules (HNs) in a Turkish cohort." *Horm.Metab Res.* 43, no. 8(July 2011):562-68.
114. P.Laurberg, K.M.Pedersen, H.Vestergaard, and G.Sigurdsson. "High incidence of multinodular toxic goitre in the elderly population in a low iodine intake area vs. high incidence of Graves' disease in the young in a high iodine intake area: comparative surveys of thyrotoxicosis epidemiology in East-Jutland Denmark and Iceland." *J.Intern.Med.* 229, no. 5(May 1991):415-20.
115. B.L.Baltisberger, C.E.Minder, and H.Burgi. "Decrease of incidence of toxic nodular goitre in a region of Switzerland after full correction of mild iodine deficiency." *Eur.J.Endocrinol.* 132, no. 5(May 1995):546-49.
116. de Roux N., M.Polak, J.Couet, J.Leger, P.Czernichow, E.Milgrom, and M.Misrahi. "A neomutation of the thyroid-stimulating hormone receptor in a severe neonatal hyperthyroidism." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81, no. 6(June 1996):2023-26.
117. J.Lueblinghoff, S.Mueller, J.Sontheimer, and R.Paschke. "Lack of consistent association of thyrotropin receptor mutations in vitro activity with the clinical course of patients with sporadic non-autoimmune hyperthyroidism." *J.Endocrinol.Invest* 33, no. 4(April 2010):228-33.
118. Z.Lin, A.Shenker, and R.Pearlstein. "A model of the lutropin/choriogonadotropin receptor: insights into the structural and functional effects of constitutively activating mutations." *Protein Eng* 10, no. 5(May 1997):501-10.
119. R.Paschke, M.Tonacchera, S.J.Van, J.Parma, and G.Vassart. "Identification and functional characterization of two new somatic mutations causing constitutive activation of the thyrotropin receptor in hyperfunctioning autonomous adenomas of the thyroid." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 79, no. 6(December 1994):1785-89.
120. R.D.Siegel and S.L.Lee. "Toxic nodular goiter. Toxic adenoma and toxic multinodular goiter." *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 27, no. 1(March 1998):151-68.
121. F.Palos-Paz, O.Perez-Guerra, J.Cameselle-Teijeiro, C.Rueda-Chimeno, F.Barreiro-Morandeira, J.Lado-Abeal, V.D.Araujo, R.Argueso, O.Barca, M.Botana, J.M.Cabezas-Agricola, P.Catalina, G.L.Dominguez,

T.Fernandez, A.Mato, A.Nuno, M.Penin, and B.Victoria. "Prevalence of mutations in TSHR, GNAS, PRKAR1A and RAS genes in a large series of toxic thyroid adenomas from Galicia, an iodine-deficient area in NW Spain." *Eur.J.Endocrinol.* 159, no. 5(November 2008):623-31.

122. D.Fuhrer, A.Tannapfel, O.Sabri, P.Lamesch, and R.Paschke. "Two somatic TSH receptor mutations in a patient with toxic metastasising follicular thyroid carcinoma and non-functional lung metastases." *Endocr.Relat Cancer* 10, no. 4(December 2003):591-600.
123. L.Duprez, J.Hermans, Van Sande J., J.E.Dumont, G.Vassart, and J.Parma. "Two autonomous nodules of a patient with multinodular goiter harbor different activating mutations of the thyrotropin receptor gene." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82, no. 1(January 1997):306-08.
124. L.Lavard, A.Sehested, J.B.Brock, J.Muller, H.Perrild, U.Feldt-Rasmussen, J.Parma, and G.Vassart. "Long-term follow-Up of an infant with thyrotoxicosis due to germline mutation of the TSH receptor gene (Met453Thr)." *Horm.Res.* 51, no. 1(1999):43-46.
125. S.Kraemer, K.Rothe, R.Pfaeffle, D.Fuehrer-Sakel, H.Till, and O.J.Muensterer. "Activating TSH-receptor mutation (Met453Thr) as a cause of adenomatous non-autoimmune hyperthyroidism in a 3-year-old boy." *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* 22, no. 3(March 2009):269-74.
126. V.Supornsilchai, T.Sahakitrungruang, N.Wongjitrat, S.Wacharasindhu, K.Suphapeetiporn, and V.Shotelersuk. "Expanding clinical spectrum of non-autoimmune hyperthyroidism due to an activating germline mutation, p.M453T, in the thyrotropin receptor gene." *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 70, no. 4(April 2009):623-28.
127. J.Maier, van Steeg H., van Oostrom C., S.Karger, R.Paschke, and K.Krohn. "Deoxyribonucleic acid damage and spontaneous mutagenesis in the thyroid gland of rats and mice." *Endocrinology* 147, no. 7(July 2006):3391-97.
128. N.P.Degtyareva, L.Heyburn, J.Sterling, M.A.Resnick, D.A.Gordenin, and P.W.Doetsch. "Oxidative stress-induced mutagenesis in single-strand DNA occurs primarily at cytosines and is DNA polymerase zeta-dependent only for adenines and guanines." *Nucleic Acids Res.* 41, no. 19(October 2013):8995-9005.
129. K.Krohn, J.Maier, and R.Paschke. "Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors." *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab* 3, no. 10(October 2007):713-20.
130. D.Russo, F.Arturi, M.Schlumberger, B.Caillou, R.Monier, S.Filetti, and H.G.Suarez. "Activating mutations of the TSH receptor in differentiated thyroid carcinomas." *Oncogene* 11, no. 9(November 1995):1907-11.
131. T.Muhlberg, K.Herrmann, W.Joba, M.Kirchberger, H.J.Heberling, and A.E.Heufelder. "Lack of association of nonautoimmune hyperfunctioning thyroid disorders and a germline polymorphism of codon 727 of the human thyrotropin receptor in a European Caucasian population." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85, no. 8(August 2000):2640-43.
132. E.M.Gabriel, E.R.Bergert, C.S.Grant, J.A.van Heerden, G.B.Thompson, and J.C.Morris. "Germline polymorphism of codon 727 of human thyroid-stimulating hormone receptor is associated with toxic multinodular goiter." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84, no. 9(September 1999):3328-35.
133. G.P.Sykotis, S.Neumann, N.A.Georgopoulos, A.Sgourou, A.Papachatzopoulou, K.B.Markou, V.Kyriazopoulou, R.Paschke, A.G.Vagenakis, and A.G.Papavassiliou. "Functional significance of the thyrotropin receptor germline polymorphism D727E." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 301, no. 4(February 2003):1051-56.
134. H.Gozu, M.Avсар, R.Bircan, S.Sahin, O.Deyneli, B.Cirakoglu, and S.Akalin. "Mutations in the thyrotropin receptor signal transduction pathway in the hyperfunctioning thyroid nodules from multinodular goiters: a study in the Turkish population." *Endocr.J.* 52, no. 5(October 2005):577-85.
135. N.R.Lemoine, E.S.Mayall, F.S.Wyllie, C.J.Farr, D.Hughes, R.A.Padua, V.Thurston, E.D.Williams, and D.Wynford-Thomas. "Activated ras oncogenes in human thyroid cancers." *Cancer Res.* 48, no. 16(August 1988):4459-63.
136. H.Namba, S.A.Rubin, and J.A.Fagin. "Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis." *Mol.Endocrinol.* 4, no. 10(October 1990):1474-79.
137. G.A.Cross, H.Suarez, F.Pitoia, D.Moncet, M.Vanegas, O.D.Bruno, and H.Niepomniszcze. "Fatal outcome of a young woman with papillary thyroid carcinoma and graves' disease: possible implication of "cross-signalling" mechanism." *Arq Bras.Endocrinol.Metabol.* 52, no. 7(October 2008):1194-200.

138. H.Niepomnische, H.Suarez, F.Pitoia, A.Pignatta, K.Danilowicz, M.Manavela, B.Elsner, and O.D.Bruno. "Follicular carcinoma presenting as autonomous functioning thyroid nodule and containing an activating mutation of the TSH receptor (T620I) and a mutation of the Ki-RAS (G12C) genes." *Thyroid* 16, no. 5(May 2006):497-503.
139. T.Kondo, S.Ezzat, and S.L.Asa. "Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia." *Nat.Rev.Cancer* 6, no. 4(April 2006):292-306.
140. O.K.Arseven, W.P.Wilkes, J.L.Jameson, and P.Kopp. "Substitutions of tyrosine 601 in the human thyrotropin receptor result in increase or loss of basal activation of the cyclic adenosine monophosphate pathway and disrupt coupling to Gq/11." *Thyroid* 10, no. 1(January 2000):3-10.

#### **IV. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## V. Publikation

Die vorliegenden Ergebnisse wurden in folgender Publikation bereits veröffentlicht:

*Somatic mutations in 33 benign and malignant hot thyroid nodules in children and adolescents.*

Eszlinger M, Niedziela M, Typlt E, Jaeschke H, Huth S, Schaarschmidt J, Aigner T, Trejster E, Krohn K, Bösenberg E, Paschke R.

Mol Cell Endocrinol. 2014 Aug 5;393(1-2):39-45. doi: 10.1016/j.mce.2014.05.023. Epub 2014 Jun 8.

## VI. Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

---

Geburtsdatum: 08.03.1985  
Geburtsort: Leipzig  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

### *Bildungsweg*

---

<i>Bis 2003</i>	<i>Allgemeine Hochschulreife</i> Uhlandgymnasium Leipzig
<i>10 / 2003 - 09 / 2006</i>	<i>Ausbildung zur Medizinisch- Technischen- Laboratoriumsassistentin</i> Medizinische Berufsfachschule des Universitätsklinikums Leipzig- AöR (MTLA)
<i>12 / 2006 - 09 / 2008</i>	<i>MTLA im Forschungslabor der Hämatologie / Onkologie, AG Edinger</i> Universitätsklinikum Regensburg
<i>10 / 2008 - aktuell</i>	<i>Medizinstudium</i> Universität Leipzig
<i>10 / 2008 – 10 / 2010</i>	<i>Studium der Humanmedizin</i> vorklinischer Studienabschnitt
<i>10 / 2010 – 10 / 2013</i>	<i>Studium der Humanmedizin</i> klinischer Studienabschnitt
<i>02 / 2012</i>	<i>Dissertation</i> Beginn der medizinisch- experimentellen Phase Universitätsklinikum Leipzig, Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie
<i>10 / 2013 – aktuell</i>	<i>Praktisches Jahr</i>
<i>Arbeit als studentische Hilfskraft:</i> <i>02 / 2010 – 12 / 2010</i>	Institut für Virologie Universitätsklinikums Leipzig Einsatzgebiet: Forschungslabor
<i>01 / 2012 – 04 / 2013</i>	Forschungslabore der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie Universitätsklinikums Leipzig Einsatzgebiet: Studienkoordination
<i>01 / 2012 – 08 / 2013</i>	Transplantationsbüro Universitätsklinikums Leipzig Einsatzgebiet: Koordination von Organtransplantationen

## VII. Danksagung

Mein tiefer Dank gebührt den polnischen Patienten und deren Familien, die durch die Bereitstellung ihrer Gewebeproben meine Arbeit erst ermöglicht haben.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Ralf Paschke, der mich während meiner Promotion betreut und geduldig gefördert hat.

Besonders möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Markus Eszlinger bedanken: Danke für dein „offenes Ohr“ und konstruktiven Rat bei fachlichen Problemen, sowie für seine Unterstützung beim Verfassen der Dissertation und Publikation.

Ebenso herzlichen Dank gebührt Frau Eileen Bösenberg, die mich mit den Arbeiten im Labor vertraut machte und mir geduldig während meiner Laborarbeit zur Seite stand.

Tiefen Dank schulde ich meiner Familie für die ständigen Ermutigungen nicht aufzugeben und die Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Lieber Christian, danke für deine Liebe und dein Verständnis während der ganzen Zeit, auch wenn es nicht immer einfach war.



### **VIII. Erklärung über die Vorbehaltlichkeit der Verfahrenseröffnung zur Verleihung des Titels Dr. med.**

Der erfolgreiche Abschluss des letzten Staatsexamens oder die Approbation zum Arzt ist die Voraussetzung für den Abschluss des Promotionsverfahrens und damit der Verleihung des akademischen Grades. Die Zulassung zum Promotionsverfahren ist insoweit nur vorläufig und steht unter der auflösenden Bedingung des Nichtbestehens des letzten Staatsexamens oder der Approbation zum Arzt. Dieser Abschluss ersetzt nach Regelung im Paragraph 12 der Promotionsordnung das Rigorosum. Das Rigorosum ist essentieller Bestandteil und notwendig zum erfolgreichen Abschluss des Promotionsverfahrens. Entsprechend der Regelung in Paragraph 12 wird das eröffnete Promotionsverfahren bei Nichtbeendigung des Studiums durch die Promotionskommission ohne Titelvergabe eingestellt.

Hiermit erkläre ich, dass mir dieser Sachverhalt im Rahmen der Eröffnung meines Promotionsverfahrens bekannt ist und ich im Falle des Fehlens der Voraussetzung des Abschlusses meines Promotionsverfahrens keine rechtlichen Ansprüche an eine Vergabe eines akademischen Grades oder Titels stelle.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift